

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig – Maximilians – Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

Rolle der Tyrosinphosphatase SHP – 1 bei der Regulation der NAD(P)H – Oxidase – Aktivität in humanen Umbilikalvenenendothelzellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität München

vorgelegt von
Barbara Gundel
geb. Engelbrecht

aus
Nürnberg

Jahr 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig – Maximilian – Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Siess
PD Dr. Ute Wilbert-Lampen

Mitbetreuung durch
den Mitarbeiter: PD Dr. med. F. Krötz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2010

Ich widme diese Dissertation meinen Eltern
Rike und Peter in tiefer Liebe und
Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	8
B. Fragestellung	25
C. Material und Methoden	27
C.1. ZELLKULTUR	27
<i>C.1.1. Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen</i>	27
<i>C.1.2. Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen</i>	27
<i>C.1.3. Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen</i>	28
C.2. MESSUNG VON O_2^- AN INTAKTEN HUVEC	28
C.3. MESSUNG DER NAD(P)H-OXIDASE AKTIVITÄT	30
C.4. MESSUNG DER SHP-1 AKTIVITÄT	30
C.5. NACHWEIS VON TYROSINPHOSPHORYLIERUNGEN DER p85- UNTEREINHEIT DER PI3-KINASE DURCH IMMUNOPRÄZIPITATION	31
<i>C.5.1. Zell-Lyse</i>	31
<i>C.5.2. Proteinbestimmung</i>	32
<i>C.5.3. Immunopräzipitation von p85</i>	32
<i>C.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	33
<i>C.5.5. Semi-Dry-Western-Blotting</i>	34
<i>C.5.6. Nachweis von phosphoryliertem Tyrosin mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz</i>	34
C.6. RAC1-PULL-DOWN-ASSAY	35
<i>C.6.1. Plasmidamplifikation</i>	36
C.6.1.1. Transformation	36

C.6.1.2.	Klonierung	36
C.6.1.3.	Plasmidpräparation	37
C.6.2.	<i>Herstellung der GST-PAK-Beads</i>	38
C.6.3.	<i>Rac1-Pull-Down</i>	39
C.6.3.1.	Zelllyse	39
C.6.3.2.	Bindung an GST-PAK-Beads	39
C.6.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
C.6.3.4.	Wet-Blotting	40
C.6.3.5.	Nachweis von Rac1 mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz	40
C.7.	IMMUNOFLUORESZENZ	40
C.8.	HEMMUNG DER SHP-1	41
C.8.1.	<i>Pharmakologische Inhibition</i>	41
C.8.2.	<i>Posttranskriptionelles Gene Silencing</i>	41
C.8.2.1.	Oligonukleotide	41
C.8.2.2.	Magnetofektionsmethode	42
C.8.2.3.	Antisense Oligonukleotid Magnetofektion	43
C.8.2.4.	RNA-Interferenz	44
C.9.	STATISTISCHE ANALYSEN	45
D.	Ergebnisse	46
D.1.	SHP-1 EXPRESSION IN HUVEC	46
D.1.1.	<i>Proteinnachweis der SHP-1 in HUVEC-Lysaten mittels Westernblot</i>	46
D.1.2.	<i>Nachweis der SHP-1 Aktivität in HUVEC und Ausschaltung ihrer Aktivität nach Antisense Magnetofektion</i>	47

D.2.	ENDOTHELIALE SUPEROXIDRADIKALBILDUNG NACH HEMMUNG DER SHP-1 DURCH NATRIUM STIBOGLUKONAT	48
	<i>D.1.1. Dosisreihe</i>	48
	<i>D.1.2. Zeitreihe</i>	49
D.3.	ENDOTHELIALE O_2^- -BILDUNG NACH HEMMUNG DER SHP-1 DURCH POSTTRANSKRIPTIONELLES GENE SILENCING	50
D.4.	NAD(P)H-OXIDASE AKTIVITÄT IN ENDOTHELZELLEN (HUVEC) NACH HEMMUNG DER SHP-1	51
	<i>D.4.1. Ausschaltung von anderen Radikalbildnern – Auswirkung auf die Radikalformation nach Hemmung der SHP-1</i>	51
	<i>D.4.2 Inhibition der NAD(P)H-Oxidase – Auswirkung auf die Radikalformation nach Hemmung der SHP-1</i>	52
	<i>D.4.3. NAD(P)H-Oxidase Aktivität nach Hemmung der SHP-1</i>	53
D.5.	MECHANISMUS DER NAD(P)H-OXIDASE INAKTIVIERUNG DURCH SHP-1	54
	<i>D.5.1. Rolle der PI3-Kinase bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase nach Hemmung der SHP-1 in HUVEC</i>	54
	<i>D.5.2. Rolle der SHP-1 bei Phosphorylierung und Dephosphorylierung der p85 Untereinheit der PI3-Kinase in HUVEC</i>	55
	<i>D.5.3. Rac1-Aktivität nach Hemmung der SHP-1 in HMEC</i>	56
	<i>D.5.4. Lokalisierung von Rac1 und gp91^{phox} nach Hemmung der SHP-1 und der PI3-Kinase in HMEC</i>	57
D.6.	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER SHP-1: VEGF UND 17β -ESTRADIOL STEuern DIE ENDOTHELIALE O_2^- -BILDUNG DURCH REGULIERUNG DER SHP-1	58
	<i>D.6.1. Steigerung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch VEGF in HUVEC</i>	59
	<i>D.6.2. Auswirkung von Estradiol auf die VEGF-bedingte Steigerung der Radikalformation in HUVEC</i>	60
	<i>D.6.3. Rolle der SHP-1</i>	61

<i>D.6.4. SHP-1 Aktivität in Anwesenheit von Estradiol und VEGF in HUVEC</i>	63
E. Diskussion	65
F. Zusammenfassung	77
G. Abkürzungsverzeichnis	80
H. Literatur	83
I. Lebenslauf	99
J. Danksagung	100

A. Einleitung

Die Interaktion reaktiver Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) mit Stickstoffmonoxid („*nitric oxide*“, NO) und vaskulären Signalmechanismen spielt eine fundamentale Rolle sowohl für die physiologische Gefäßfunktion als auch bei pathophysiologischen Veränderungen der Blutgefäßstruktur und –funktion (Albrecht *et al.*, 2003; Michiels, 2003). Das Verständnis von Regulationsmechanismen der Bildung von ROS und der Auswirkung einer vermehrten Bildung stellt daher eine wichtige Grundvoraussetzung dar, um die Pathogenese von Gefäßerkrankungen, wie Atherosklerose oder *Remodeling* durch Hypertonie besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

In den Zellen des menschlichen Gefäßendothels (Endothelzellen) sind antioxidative Enzyme wie beispielsweise die Katalase, die Superoxiddismutase oder die Gluthationperoxidase vorhanden, die überhöhte zelluläre Spiegel von ROS verhindern (Wolin, 2000). Ein erhöhter zellulärer Spiegel von ROS wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet und spielt eine Rolle in der Pathophysiologie der unterschiedlichsten Erkrankungen, wie z. B. bei septischem Schock (Galley *et al.*, 1997), Diabetes mellitus (Bonnetfont-Rousselot *et al.*, 2004), Atherosklerose (Touyz, 2004), und dem Altern (Beckmann, 1998). Bei der Pathogenese der Atherosklerose spielen ROS eine wichtige Rolle, denn eine gesteigerte endotheliale ROS-Bildung kann durch Reaktion mit NO und dessen Inaktivierung unter Bildung des sehr reaktiven Peroxynitrits zur Schädigung des Endothels und zur dauernden Endotheldysfunktion führen. Eine Vielzahl von Daten belegt, dass die endotheliale Funktionsstörung als initialer Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose eine zentrale Bedeutung besitzt (Griendling *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998).

Das Endothel

Die Funktion des Endothels besteht nicht nur in der Bildung einer anatomischen Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und tiefer liegenden Strukturen der Gefäßwand bzw. dem Extrazellularraum. Das Endothel übt vielmehr als metabolisch aktives Organ eine Vielzahl wichtiger zusätzlicher Funktionen aus, die insgesamt zur Erhaltung der vaskulären Homöostase beitragen (Michiels, 2003). Die funktionelle Integrität des Endothels ist daher von großer Bedeutung: Es beeinflusst den Gefäßtonus und somit Organdurchblutung und peripheren Widerstand, kontrolliert den Transport von löslichen Faktoren in die Gefäßwand wie auch in den Extrazellularraum, schützt die tiefer liegenden Strukturen der Gefäßwand vor potentiell schädigenden Substanzen bzw. dem Einwandern von inflammatorischen Zellen aus der Blutzirkulation, wirkt normalerweise der Aktivierung von zirkulierenden Blutzellen und Thrombozyten entgegen und ist außerdem bei der Regulation von lokalen Gerinnungs- bzw. inflammatorischen Reaktionen maßgeblich beteiligt. Aufgrund dieser Eigenschaften verhindert das intakte Endothel das Entstehen und Fortschreiten von Prozessen, die für die Pathogenese von Gefäßerkrankungen eine wichtige Rolle spielen, es wirkt also *vasoprotektiv*.

Als wichtiger Mediator der vasoprotektiven Effekte des Endothels gilt das NO, welches vor allem von einem im Endothel selbst lokalisierten Enzym, der endothelialen Isoform der NO-Synthase (oder endotheliale NO-Synthase, eNOS) gebildet wird (Albrecht *et al.*, 2003; Michiels, 2003).

Tabelle 1 fasst die wichtigsten vasoprotektiven Wirkungen des endothelialen NO zusammen.

Tabelle 1: Anti-atherogene Wirkungen eines funktionell intakten Endothels, das NO produziert

(nach Bonetti *et al.*, 2003)

-
- Gefäßdilatation (Blutdrucksenkung)
 - Antioxidative Effekte
 - Anti-inflammatorische Effekte / Inhibition der leukozytären Adhäsion und Migration
 - Inhibition der glattmuskulären Proliferation und Migration
 - Inhibition der thrombozytären Adhäsion und Aggregation
 - Antikoagulatorische Effekte
 - Profibrinolytische Effekte

Endotheldysfunktion und kardiovaskuläre Ereignisse

Eine Endotheldysfunktion besteht beispielsweise, wenn infolge einer verminderten NO Bildung oder NO Verfügbarkeit normalerweise vorhandene NO vermittelte Wirkungen ausfallen. Dadurch vermindert sich die NO-abhängige Vasodilatation und in der Folge kann sogar eine paradoxe Vasokonstriktion nach Stimulation mit endothelialen Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin (Ludmer *et al.*, 1986) auftreten. Untersuchungen zu diesem Thema wurden nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* durchgeführt. Anhand der Gefäßmotorik von Koronarien oder Unterarmarterien nach Acetylcholin- bzw. Adenosinabgabe kann so klinisch die Endothelfunktion beurteilt werden (Corretti *et al.*, 2002).

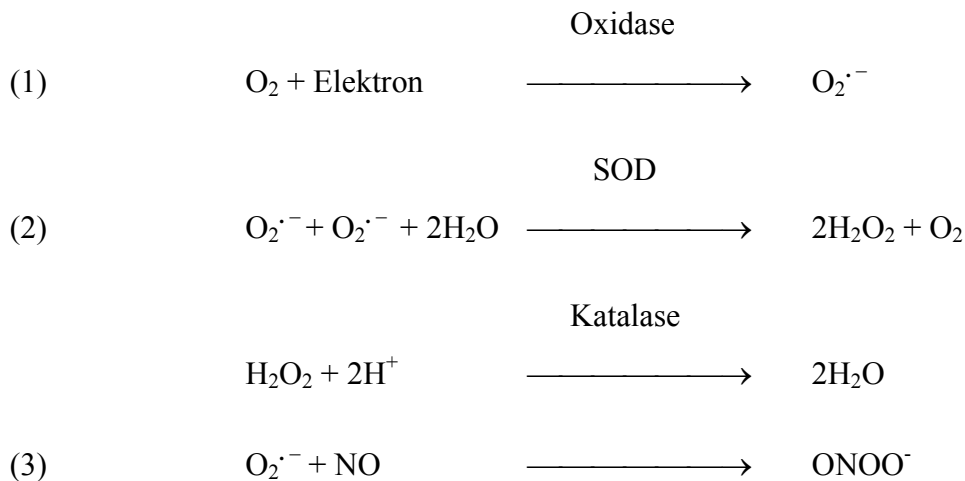
In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass eine vorhandene Endotheldysfunktion (die entweder in Koronarien (Halcox *et al.*, 2002; Schachinger *et al.*, 2000; Suwaidi *et al.*, 2000) oder Unterarmarterien (Gokce *et al.*, 2002; Heitzer *et al.*, 2001; Perticone *et al.*, 2001) nachgewiesen wurde) prognostische Bedeutung für künftige kardiovaskuläre Ereignisse besitzt.

ROS, insbesondere Superoxidanionen, reduzieren die Bioverfügbarkeit von NO und tragen auf diese Art und Weise erheblich zur Endotheldysfunktion bei (Wolin *et al.*, 2000). Daher wurde dieses Thema in den letzten Jahren zu einem wichtigen Gegenstand für experimentelle Studien.

Ebenfalls erscheint das wachsende klinische Interesse an diesen Beobachtungen allein dadurch gerechtfertigt, dass die Gabe von Antioxidantien eine abgeschwächte NO-abhängige Vasodilatation nach starkem Zigarettenkonsum unmittelbar verbessern kann (Neunteufl *et al.*, 2000). Dennoch konnte bisher in klinischen Studien kein Langzeiteffekt bei chronischer Endotheldysfunktion (Neunteufl *et al.*, 2000) oder Überlebensvorteil bei kardiovaskulären Erkrankungen (Vivekananthan *et al.*, 2003) nach Gabe von Antioxidantien gezeigt werden.

ROS-Entstehung und potentielle Interaktionen mit Signalsystemen und deren Bedeutung

Die Produktion von ROS beginnt häufig mit der Reduktion molekularen Sauerstoffs (O_2), welche durch verschiedene Oxidasen, die später noch genauer beschrieben werden, katalysiert wird. Dabei entsteht das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) (Reaktion 1). Bei physiologischem pH-Wert stellt das $O_2^{\cdot-}$ chemisch gleichzeitig ein Sauerstoffradikal sowie ein negativ geladenes Anion dar (Fridovich, 1983). Während seine Radikal-Eigenschaften die wesentlichen chemischen Reaktionen des $O_2^{\cdot-}$ bedingen, könnte seine negative Ladung verantwortlich dafür sein, dass $O_2^{\cdot-}$ die Zellmembran nur durch bestimmte Anionenkanäle, aber nicht durch Diffusion passieren kann (Fridovich, 1995). Superoxidanionen reagieren mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$, Reaktion 3) und reduzieren damit die Verfügbarkeit eines der wichtigsten vasoprotektiven endothelialen Signalmoleküle. Aus diesem Grund ist die Rolle der Superoxiddismutase (SOD) im Endothel wichtig, denn sie ist in der Lage, $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abzubauen, welches wiederum von der Katalase weiter zu Wasser (H_2O) abgebaut wird (Reaktion 2) (Wolin, 2000).



Die Menge des verfügbaren NO kann daher durch die Aktivität der SOD beeinflusst werden, die im Intrazellularraum und in den Mitochondrien vorhanden ist (Mügge *et al.*, 1991, *Circ. Res.*; Mügge *et al.* 1991, *Am. J. Physiol.*; Fridovich, 1997): $O_2^{\cdot-}$ reagiert mit NO zu Peroxynitrit, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit $6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ca. um das dreifache schneller als die enzymatische Inaktivierung von $O_2^{\cdot-}$ durch die Superoxiddismutase ist (Huie *et Padmaja*, 1993; Koppenol *et al.*, 1992). Das bedeutet,

dass bei gesteigerter O_2^- -Bildung dieses bevorzugt mit NO reagiert, sodass weniger NO zur Verfügung steht. Welche bedeutsamen Folgen dies im Rahmen der Entstehung und Progression von Endotheldysfunktion und Atherosklerose haben kann wurde bereits in vorhergehenden Abschnitten beschrieben.

Unter den ROS spielt das Superoxidanion schon deshalb eine zentrale Rolle, weil es eine wichtige Ausgangsquelle für andere ROS wie z. B. $\bullet OH$, $\bullet H_2O_2$ oder $ONOO^-$ ist. Damit resultiert eine gesteigerte endotheliale O_2^- -Bildung nicht nur in einer Einschränkung der Endothel-abhängigen Vasodilatation und anderen bereits genannten NO-vermittelten Funktionen durch Reduktion seiner Bioverfügbarkeit, sondern O_2^- und seine „ROS-Partner“ entfalten auch über andere Reaktionsmöglichkeiten ihre Wirkungen an Gefäßen (Krötz *et al.*, 2004, *ATVB*). O_2^- selbst kann beispielsweise die Reaktion von LDL („*low density lipoprotein*“) zu oxidiertem LDL (oxLDL) (Inoue *et al.*, 1998; Steinbrecher, 1988) fördern, einem wichtigen Faktor bei der Entstehung von Atherosklerose (Chisolm *et al.*, 2000; Nielsen, 1999).

Andere ROS wie $ONOO^-$, OH^- und H_2O_2 können durch membranschädigende Lipidperoxidation, DNA-Fragmentierung, Induktion von Apoptose und durch Proteinmodifikationen ($ONOO^-$ nitriert z. B. Proteintyrosinreste und moduliert damit Phosphotyrosin-abhängige Signalwege) (Alvarez *et al.*, 1999; Klotz *et al.*, 2002; Minetti *et al.*, 2002) zu Zellschäden oder Änderungen von zellulären Signalwegen führen (Ballinger *et al.*, 2000; Ferdinandy *et al.*, 2003; Knepler *et al.*, 2001; Virag *et al.*, 2003; Zouki *et al.*, 2001).

Eine weitere Bedeutung von O_2^- nämlich als Mediator des Reperfusionsschadens nach vorausgehender Ischämie ist ebenfalls gesichert: Nach einem ischämischen Ereignis und der darauf folgenden Reperfusion werden unter anderen ROS auch Superoxidanionen gebildet, die zelluläre Strukturen wie z. B. Membranlipide oxidieren und damit eine Schädigung des Gewebes und eine Erhöhung der Endothelpermeabilität herbeiführen können (Haklar *et al.*, 1998; Schoenberg *et al.*, 1993).

Ein anderer Bereich, in dem ROS eine pathophysiologische Wirkung entfalten, ist die Modulation von Gen- und Proteinexpression durch Regulation von Transkriptionsfaktoren (wie beispielsweise „*nuklear factor- κ B*“ (*NF- κ B*) und Aktivator Protein-1). Dazu kommen noch andere pathophysiologische Mechanismen, auf die hier aber im Weiteren nicht näher eingegangen wird (Kunsch *et al.*, 1999). So erhöht oxidativer Stress beispielsweise die Expression von Adhäsionsproteinen, die wiederum zur vermehrten Rekrutierung von inflammatorischen Zellen führt, sowie die Expression weiterer Moleküle. Beispiele für solche Moleküle mit Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen sind CSF-1 (*Colony Stimulating Factor*) und MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*), welche gehäuft in atherosklerotischen Plaques vorkommen (Takeya *et al.*, 1993). Superoxidanionen steigern in mesangialen Zellen dosisabhängig die mRNA-Expression von CSF-1 und MCP-1 und stimulieren TNF α (Tumornekrosefaktor α) und aggregiertes IgG, welche wiederum selbst bei der Expression von CSF-1 und MCP-1-Proteinen eine Rolle spielen (Satriano *et al.*, 1993). Außerdem konnte an glatten Muskelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II und PDGF („*platelet derived growth factor*“) eine O_2^- -abhängige MCP-1 Expression (Chen *et al.*, 1998; Marumo *et al.*, 1997) gezeigt werden.

Superoxidanionen scheinen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Modulation von Signalmechanismen zu spielen, die u.a. in vaskulären Zellen Wachstum und Tod regulieren. Diese beiden gegensätzlichen Zellmechanismen sollten beispielsweise beim *Remodeling* von Gefäßen (z.B. postpartum in Gefäßen von neonatalen Lämmern (Cho *et al.*, 1995)) kontrolliert nebeneinander ablaufen (Wolin *et al.*, 2002). Über die Bildung von ROS werden intrazelluläre Signale vermittelt, die Proliferation und Apoptose ähnlich wie natürliche Wachstumsfaktoren stimulieren (Clement *et al.*, 1999). Die einzelnen Mechanismen sind in Abb. 1 beschrieben (Wolin *et al.*, 2002). Über G-Proteine (Ras, Raf, Rac), Kinasen (Protein-Tyrosin-Kinasen, MAP-Kinase, Apoptose-Stimulierende-Kinase, etc.) und Phospholipasen gelangt die Information bis zum Zellkern, wo die Genexpression durch die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Kamata *et al.*, 1999).

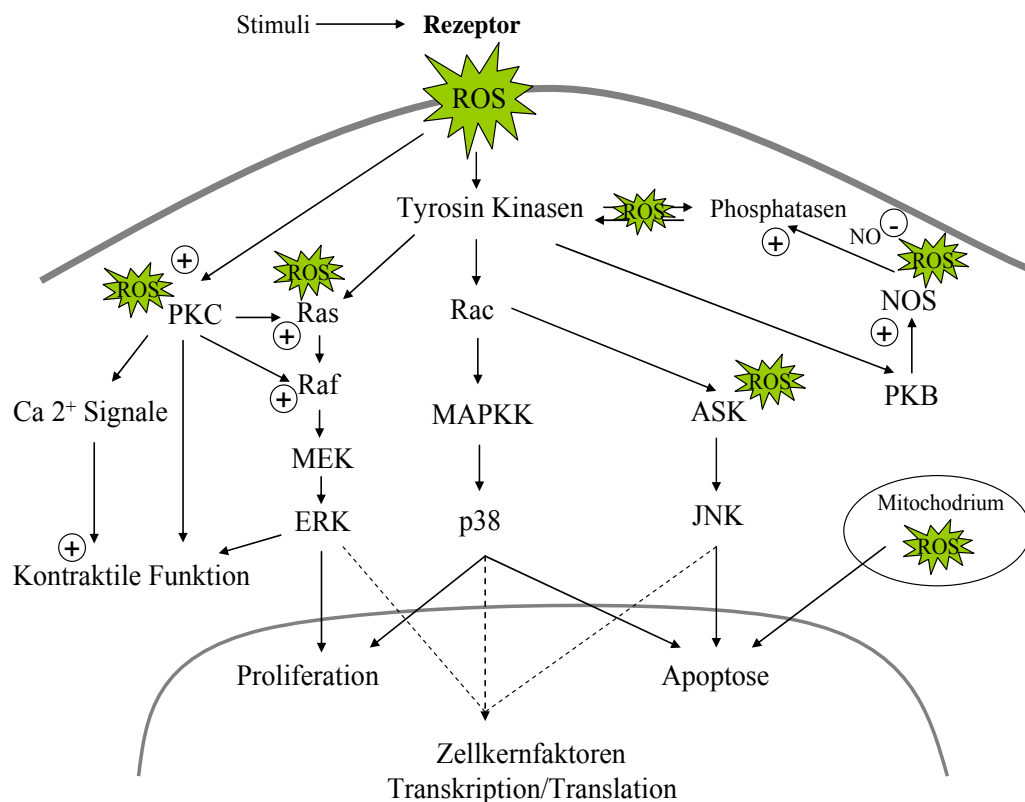


Abbildung 1: Mögliche ROS abhängige Signalwege zur Proliferation und Apoptose

Signalwege für Interaktionen zwischen ROS und Signalsystemen, die die Genexpression von Zellwachstum und Apoptoseprozessen in vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen beeinflussen. MEK und MAPKK sind MAP-Kinase („mitogen-activated protein kinase“)-Kinasen. ERK („extracellular signal-regulated kinase, JNK („janus-activated kinase“) und p38 sind MAP-Kinasen. Ras, Raf, und Rac sind G-Proteine. PKB: Protein-Kinase B; ASK = Apoptose-Stimulierende-Kinase (nach Wolin *et al.*, 2002)

Der Spiegel von O_2^- wird von der Balance zwischen seiner Bildung durch die unterschiedlichen Oxidasen und Autooxidationsprozesse und seinem Abbau *via* SOD und der Reaktion mit verschiedenen Molekülen determiniert. Neben SOD und Gluthationperoxidase reduzieren potentiell auch Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure (Vitamin C) oder Tocopherol (Vitamin E) O_2^- , obwohl viele dieser Substanzen normalerweise nicht in Konzentration vorhanden sind, um mit NO oder der SOD zu konkurrieren. Die zelluläre Aufnahme von O_2^- beispielsweise durch Erythrozyten im Blut ist darüber hinaus ein potentiell signifikanter Mechanismus, um O_2^- aus dem Plasma zu entfernen (Wolin *et al.*, 2002).

Die Produktion von Sauerstoffradikalen kann in vaskulären Zellen über verschiedene enzymatische Wege stattfinden:

1. **Xanthinoxidase:** Oxidation von Xanthin

Es gibt Befunde die zeigen, dass die Xanthinoxidase bei der O_2^- -Bildung in normoxischen vaskulären Zellen keine signifikante Rolle spielt. Besonders bei hypoxischen bzw. anoxischen Zellen sowie während der Reperfusion nach Ischämie scheint die Xanthinoxidase jedoch vermehrt O_2^- zu bilden (Li *et al.*, 2002; Pritsos, 2000; Sohn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998; Zulueta *et al.*, 1997).

2. **Mitochondriale Oxidationskette** (Cadenas *et al.*, 2000; St Pierre *et al.*, 2002)

Bei der Atmungskette wird in den Mitochondrien aufgenommenes O_2 reduziert, so dass es schliesslich bei der Reaktion mit H^+ zur Bildung von Wasser kommt. Dabei wird in verschiedenen Schritten ATP generiert. Trotz hoher Effektivität gibt es an bestimmten Stellen „Lecks“, an denen ein Elektron (e^-) direkt auf O_2 übertragen werden kann, was zur Bildung von O_2^- führt. Dabei werden ca. 1 – 2 % der täglich aufgenommenen Menge von O_2 in O_2^- umgesetzt. Dem steht allerdings ein effektives antioxidatives System gegenüber, welches SOD und Katalase in hohen Konzentrationen enthält (Cadenas *et al.*, 2000).

3. **Mikrosomale Cytochrom P 450-Oxidoreduktasen** (Fleming *et al.*, 2001; Puntarulo *et al.*, 1998)

In Bezug auf eine relevante O_2^- -Bildung in Endothelzellen gibt es hier unterschiedliche Meinungen. Eine Gruppe fand Hinweise darauf, dass die Isoform CYP 2C8/9 in Endothelzellen O_2^- produziert (Fleming *et al.*, 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Hypothese nicht bestätigen: Bei der Isoform CYP 2C8/9 handelt es sich um die EDHF-Synthetase („*endothelium-derived hyperpolarizing factor*“), welcher eher vasoprotektive Wirkung zugeschrieben wird (Krötz *et al.*, 2004, *ATVB*; Bolz *et al.*, 2000).

4. **Endotheliale NO-Synthase (eNOS):**

Die NO-Synthase bildet normalerweise NO, indem sie in eine der NH_2 Seitengruppen des L-Arginins ein Sauerstoffatom einführt und dann nach weiteren Reaktionen NO abspaltet, sodass L-Citrullin verbleibt. Als Kofaktor für diese Reaktion werden Tetrahydrobiopterin, O_2 und NADPH benötigt.

Interessant ist, dass die NO-Synthase unter bestimmten Bedingungen selbst eine O_2^- -Quelle darstellen kann. Besonders bei Kofaktormangel (L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin) wird diese „Entkopplung“ der eNOS gefördert. Dieser Zustand wird durch die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren unterstützt (Cosentino *et al.*, 1998; Heitzer *et al.*, 2000; Hishikawa *et al.*, 1997).

6. Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) spielen eine Rolle bei der Prostaglandin- und Thromboxansynthese, worauf hier nicht weiter eingegangen wird. Eine Komponente der COX, die Peroxidasefunktion hat, besitzt die Fähigkeit, während der Prostaglandinsynthese NAD(P)H und andere Substanzen zu oxidieren. Dies kann zu Autooxidationsvorgängen führen (Reaktionen mit molekularem Sauerstoff), was wiederum Sauerstoffradikale entstehen lässt (Wolin *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 1996)

Unter normalen Umständen scheint jedoch ein weiteres, in den letzten Jahren immer besser charakterisiertes Enzymsystem, nämlich die **NAD(P)H-Oxidase** die wichtigste Quelle für O_2^- in Endothel- und glatten Muskelzellen darzustellen (Griendling *et al.*, 2000).

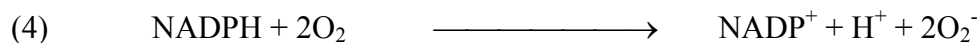
Hauptquelle von O_2^- im Endothel: die NAD(P)H-Oxidase

Obwohl O_2^- nicht nur im Endothel gebildet werden kann, sondern auch in anderen Zellen der Gefäßwand (beispielsweise in der glatten Gefäßmuskulatur und in der Adventitia (Griendling *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995)), in neutrophilen Granulozyten oder in Thrombozyten (Krötz *et al.*, 2002, *Blood*), liegen einige Befunde vor, die dafür sprechen, dass in funktionell intakten, ruhenden Endothelzellen ein hoher Anteil der O_2^- -Bildung innerhalb der Gefäßwand stattfindet: Nach Entfernung des Endothels in intakten Gefäßsegmenten konnte in direkten Messungen gezeigt werden, dass die extrazelluläre Konzentration von O_2^- reduziert war (Ohara *et al.*, 1993; Warnholtz *et al.*, 2002).

Es sprechen zahlreiche Befunde dafür, dass die NAD(P)H-Oxidase auch eine Hauptquelle der pathophysiologisch vermehrten O_2^- -Bildung im Endothel zu sein scheint. Die sogenannte „vaskuläre Form der NAD(P)H-Oxidase“, bei der es sich um eine Isoform der

gut untersuchten neutrophilen NAD(P)H-Oxidase handelt (Griendling *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995), besteht aus einem Multienzymkomplex mit zwei membranständigen Untereinheiten (gp91^{phox} und p22^{phox}) und drei zytoplasmatischen Untereinheiten (p67^{phox}, 47^{phox} und Rac1). *Phox* steht dabei für *Phagozyte Oxidase*. Die zytoplasmatischen Untereinheiten haben regulatorische Funktion, während die membranständigen ein katalytisches Zentrum tragen. Bei Aktivierung assoziieren die Untereinheiten miteinander an der Zellmembran (Babior, 1999).

Die Bildung von O₂⁻ erfolgt dabei nach folgender Reaktion (4):



p22^{phox} und gp91^{phox} bilden als Heterodimer die katalytische Einheit des Enzyms, das Cytochrom b558. Diese beiden Untereinheiten binden die prosthetischen Gruppen FAD und Häm, die an der Elektronenübertragung von NADPH auf das molekulare O₂⁻ beteiligt sind.

Unlängst wurde entdeckt, dass die katalytische Untereinheit gp91^{phox} nur ein Mitglied einer ganzen Familie von homologen Proteinen ist, die Nox (für NADPH-Oxidase) genannt werden (Lassegue *et al.*, 2003; Banfi *et al.*, 2000; Lambeth *et al.*, 2000; Lambeth, 2002). Vermutlich transferieren alle Nox-Familienmitglieder Elektronen von einem reduzierten Substrat auf molekularen Sauerstoff in einer der gp91^{phox} (Nox 2) ähnlichen Art und Weise. In vaskulären Zellen werden verschiedene Nox-Proteine exprimiert: Nox 1, Nox 2 (gp91^{phox}), Nox 4 und Nox 5. In Endothelzellen ist vermutlich Nox 4 die wichtigste Untereinheit (Krötz *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2001; Sorescu *et al.*, 2002; Lassegue *et al.*, 2003). Ebenso scheint in Endothelzellen NADH und nicht NADPH das Hauptsubstrat zu sein (Shiose *et al.*, 2001; Somers *et al.*, 2000), jedoch existieren hierzu unterschiedliche Befunde.

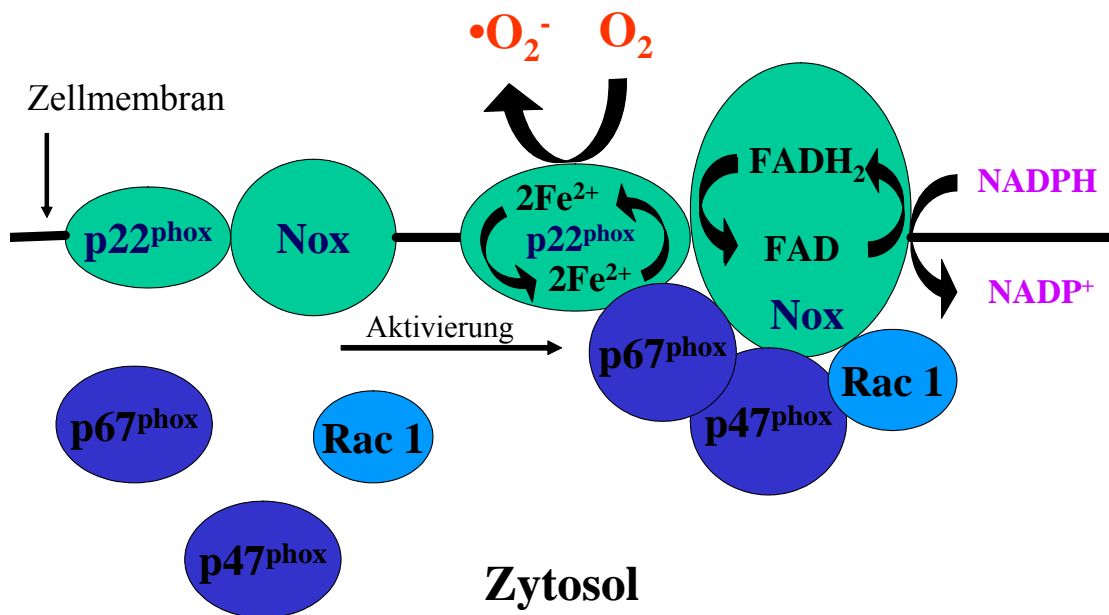


Abbildung 2 Aufbau der endothelialen NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist ein Multienzym-Komplex mit membranständigen (Nox, p22^{phox}) und zytosolischen Untereinheiten (p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1). Nach Aktivierung kommt es zu einer Membran-Translokation der zytosolischen Einheiten und damit zur Bildung des aktivierten Enzym-Komplexes.

Rac Proteine (Rac 1, 2 und 3) stellen eine Subfamilie der monomeren Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen) dar. Sie sind an der Regulation einer großen Anzahl von universellen und wichtigen zellulären Funktionen wie beispielsweise Transkription, Translation, Proteinsynthese, Eintritt in den Zellzyklus, etc. beteiligt. Außerdem kontrollieren Rac-Proteine zusätzlich Zelltyp-spezifische Funktionen wie beispielsweise die Sekretion in Mastzellen. Darüber hinaus bilden sie einen Teil des NAD(P)H-Oxidase Komplexes in neutrophilen Granulozyten (Bishop *et al.*, 2000) und in vaskulären Zellen (Sohn *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*; Welch *et al.*, 2003; Krötz *et al.*, 2005; Krötz *et al.*, 2007).

In Endothelzellen konnten alle Untereinheiten der neutrophilen NAD(P)H-Oxidase auf mRNA- und auf Proteinebene nachgewiesen werden (Bayraktutan *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002). Allerdings ist zu beachten, dass funktionell große Unterschiede zwischen der

vaskulären und der neutrophilen Form nachzuweisen sind. So ist beispielsweise die vaskuläre Form konstitutiv aktiv, im Gegensatz zur neutrophilen Form, welche einen „on / off“ Charakter besitzt (Babior, 1999; Griendling *et al.*, 2000). Aufgrund der konstitutiven Aktivität in Endothelzellen, kann man dort eine basale Freisetzung von O_2^- nachweisen (Gragasin *et al.*, 2003; Rueckschloss *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2000, *Br. J. Pharmacol.*; Krötz *et al.*, 2002, *ATVB*; Krötz *et al.*, 2005; Krötz *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2003).

Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase

Unter pathophysiologischen Bedingungen wird von der endothelialen NAD(P)H-Oxidase vermehrt O_2^- gebildet (Meyer *et al.*, 2000; Ohara *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001; Warnholtz *et al.*, 1999). Wie die Regulierung des Enzyms in vaskulären Zellen erfolgt, war zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit noch unklar und stellt darin eine zentrale Frage dar.

Faktoren, die zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in VSMC führen sind beispielsweise VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), Angiotensin II, auf welche noch näher eingegangen werden, PDGF, $TNF\alpha$ (Tumornekrosefaktor α) und die Membrandepolarisation (Sohn *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*; Krötz *et al.*, 2002, *ATVB*). VEGF ist ein endothelialer Wachstumsfaktor, der über den KDR („kinase-insert domain-containing receptor“, VEGF Rezeptor 2) die NAD(P)H-Oxidase zur O_2^- -Freisetzung stimuliert (Ushio-Fukai *et al.*, 2002).

Es ist bekannt, dass Angiotensin II die glattmuskuläre O_2^- -Produktion über den Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1 stimuliert (Griendling *et al.*, 1994). In Endothelzellen können allerdings unter bestimmten Bedingungen die Rezeptorsubtypen 1 und 2 (AT1-R und AT2-R) in der gleichen Zelle exprimiert werden (Dimmeler *et al.*, 1997; Pueyo *et al.*, 1995). Dabei wirkt der AT2-R gegenüber dem AT1-R hinsichtlich einiger Zellfunktionen antagonistisch. Die Aktivierung des AT1-R fördert die O_2^- -Freisetzung im Gegensatz zur Aktivierung des AT2-R. Der AT2-R besitzt vasoprotektive Wirkung: Die selektive Stimulation des AT2-R senkt laut einiger Befunde den Blutdruck (Barber *et al.*, 1999; Ichiki *et al.*, 1995) und hemmt beispielsweise die Zellproliferation (Munzenmaier *et al.*, 1996; Stoll *et al.*, 1995; Tsuzuki *et al.*, 1996).

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Steigerung der O_2^- -Freisetzung durch Stimulation mit Angiotensin erreicht werden. Nach Hemmung des AT2-R wurde beobachtet, dass die O_2^- -Freisetzung nach Angiotensin Stimulation im Vergleich zum Ansatz ohne Hemmung des AT2-R noch verdoppelt wurde (Sohn *et al.*, 2000, *Br. J. Pharmacol.*).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Hemmung von Tyrosin-Kinasen (Enzyme, die Proteine an Tyrosinresten phosphorylieren) diesen Effekt senken und eine unspezifische Hemmung von Tyrosin-Phosphatasen (Enzyme, die Proteine an Tyrosinresten dephosphorylieren) diesen Effekt steigern konnten. Als Quelle der so beeinflussten O_2^- -Freisetzung wurde in diesen Experimenten die NAD(P)H-Oxidase identifiziert. Wurde der AT2-R selektiv stimuliert, fand eine Aktivierung zellulärer Tyrosin-Phosphatasen statt. Insbesondere die Aktivität der SHP-1 (Src Homologie Domänen enthaltende Phosphatase 1) konnte deutlich gesteigert werden (Sohn *et al.*, 2000, *Br. J. Pharmacol.*).

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem AT2-R, der SHP-1 und der NAD(P)H-Oxidase konnte allerdings in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Verbindung zwischen dem AT2-R und der SHP-1 in negativen zellulären Signalwegen (Cui *et al.*, 2001; Shibasaki *et al.*, 2001).

Auf diesem Wege könnte der AT2 Rezeptor seine protektiven Wirkungen durch Senkung der O_2^- -Produktion entfalten. Dies führte uns zu der Überlegung, ob die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase nicht unter anderem *via* SHP-1 und weiteren De- bzw. Phosphorylierungen an Tyrosinenden reguliert werden könnte.

SHP-1 in zellulären Signalwegen

Tyrosinphosphorylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von Signalen innerhalb der Zelle. Die Phosphorylierung von Tyrosinen an Seitenketten von Proteinen kann deren Enzymaktivität, Lokalisierung in der Zelle und / oder die Interaktion von Proteinen und damit die Bildung von Signalkomplexen steuern.

Zwei unterschiedliche Arten von Enzymen regulieren Tyrosinphosphorylierungen: Protein Tyrosin Kinasen (PTKs), die Phosphorylierungsreaktionen katalysieren und Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs), die für die Dephosphorylierung verantwortlich sind. Das

Verständnis der Funktion dieser Enzyme und die Entdeckung ihrer intrazellulären Effektorproteine könnten möglicherweise der Schlüssel für das Verstehen von wichtigen Schritten der zellulären Signaltransduktion sein (Neel *et al.*, 2003). Während zahlreiche Untersuchungen die Rolle der PTKs adressieren (Schlessinger, 2000; Schlessinger *et al.* 1992), wusste man zum Beginn dieser Arbeit über PTPs noch relativ wenig. Die PTPs umfassen eine große Superfamilie (~ 90 Mitglieder in humanen Zellen); die klassischen PTPs (~ 40) enthalten eine 240 – 250 Aminosäuren lange „PTP-Domäne“, die von diversen Regulator-domänen flankiert wird und absolute Spezifität zur Hydrolyse von Phosphotyrosin entfaltet. Weiterhin können klassische PTPs in „transmembranständige“ (in der Membran verankert), in „nicht-transmembranständige“ und in „rezeptorartige“ (RPTPs) PTPs unterteilt werden (Neel *et al.*, 2003). Die SHPs gehören zur Subfamilie der nicht-transmembranständigen PTPs, die SH2 Domänen enthalten. In Wirbeltieren kommen zwei Arten vor: SHP-1 und SHP-2 (Van Vactor *et al.*, 1998; Feng, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

Die SHP-1 (auch als SHPTP-1, SHP, HCP oder PTPIC bezeichnet) wird im Gegensatz zur SHP-2, welche ubiquitär vorkommt, in erster Linie in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Sie enthält zwei N-terminal lokalisierte Src Homologie 2 (SH2)-Domänen, eine einzelne Phosphatase-Domäne und ein C-terminales Ende, das zwei Seiten zur Tyrosin-Phosphorylierung einschließt. Charakteristischerweise können die zwei phosphorylierbaren, am C-terminalen Ende gelagerten Stellen von Rezeptor-bzw. *Non-Rezeptor*-Protein Tyrosin Kinasen (PTK) phosphoryliert werden (Zhang *et al.*, 2000).

Weitere Faktoren, die zu einer Aktivierung der NAD(P)-Oxidase führen

- **Protein Kinase C (PKC):** In neutrophilen Granulozyten wird die $p47^{\text{phox}}$ durch die Serin / Threonin Kinase PKC phosphoryliert und stimuliert (Lassegue *et al.* 2002). Ebenso konnte nach Stimulierung mit PDGF („*platelet derived growth factor*“) oder Angiotensin II in vaskulären Zellen (in diesem Fall in glatten Muskelzellen) die O_2^- -Produktion durch PKC-Inhibitoren reduziert werden (Seshiah *et al.*, 2002; Touyz *et al.* 2001; Yasunari *et al.*, 2002; Marumo *et al.*, 1997).
- **Phospholipase D:** In glatten Muskelzellen (VSMC: „*vascular smooth muscle cells*“) aktiviert die Phospholipase D (PLD) über die Produktion von

Phosphatidsäure (PA) als Mediator die O_2^- -Produktion (Griendling *et al.*, 1994; Touyz *et Schiff*rin, 1999). Die Inkubation von VSMC mit unspezifischen PLD-Inhibitoren (*Sphinganine*, *Suramin*) reduzierte in der Tat die Angiotensin II induzierte ROS-Produktionssteigerung (Touyz *et Schiff*rin, 1999; Lassegue *et Clempus* 2003).

- **Phospholipase A₂**: Nach Aktivierung der Phospholipase A₂ werden freie Fettsäuren produziert, die in VSMC die NAD(P)H-Oxidase Aktivität steigern. In VSMC-Homogenaten erhöhen Arachidonsäure und Linolensäure spezifisch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase. Nach Inhibition der Phospholipase A₂ kann eine Thrombin-induzierte Steigerung der ROS-Produktion in Endothelzellen verhindert werden (Griendling *et al.*, 1994; Zafari *et al.*, 1999; Lassegue *et Clempus* 2003).
- **Rac 1**: Stimulatoren der NAD(P)H-Oxidase Aktivität wie Angiotensin II oder Membran-Depolarisierung erhöhen die Expression von Rac1, seine GTPase Aktivität und führen zur Translokation an die Membran als wichtigem Aktivierungsschritt (Sohn *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2000; Wassmann *et al.*, 2001; Seshiah *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 1999). Wie Rac1 in Endothelzellen aktiviert wird, war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch unklar. Da es sich bei Rac 1 wie bereits beschrieben um eine Untereinheit der NAD(P)-Oxidase handelt, lag es für uns nahe, mögliche *Upstream*-Aktivierungswege von Rac 1 zu finden.

Aus anderen zellulären Systemen ist als *Upstream*-Aktivator von Rac beispielsweise die **Phosphatidylinositol 3-Kinase** (PI3-K) bekannt (Lassegue *et Clempus*, 2003). Die PI3-K gehört zu den Lipidkinasen und besteht aus 2 heterodimeren Untereinheiten: eine katalytische 110 kDa große Untereinheit (p110) und eine regulatorische 85 kDa große Untereinheit (p85). Von den bekannten p85 Untereinheiten enthalten fast alle zwei Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen, die es p85 möglich machen, Phosphotyrosin in einer bestimmten Aminosäure-Kombination zu binden. Alle Mitglieder der p85 Familie enthalten eine Bindungsstelle für p110, die zwischen den zwei SH2 Domänen lokalisiert ist. Die Unterschiedlichkeit der Protein Interaktionsdomänen, die rund um die p85 Familie gefunden wurden, führt zu den breiten Möglichkeiten von Signalproteinen und –wegen über die die PI3-K eine Rac Aktivierung bewirken kann (Cuevas *et al.*, 1999; Cuevas *et al.*, 2001).

Die Inhibition der PI3-K mit Wortmannin und LY-294002 führt in VSMC zu einer Reduktion der durch PDGF oder Angiotensin II induzierten ROS-Produktionssteigerung und gleichzeitig zur Reduktion der Angiotensin II induzierten Rac-Aktivierung (Lassegue *et al.* Clempus, 2003).

Cuevas *et al.* zeigten 1999 die Dephosphorylierung der p85 Untereinheit der PI3-K durch die SHP-1. Dieser Vorgang geht mit einer Reduktion der PI3-K Aktivität einher. Dies führte uns zu der Überlegung, ob die SHP-1 möglicherweise die NAD(P)H-Oxidase über Tyrosinphosphorylierungsschritte *via* PI3-K und Rac regulieren könnte.

Andere *Upstream*-Aktivatoren von Rac (Lassegue *et al.* Clempus, 2003):

- **EGF-Rezeptor** (*Epidermal-Growth-Factor*)

Die Angiotensin II induzierte Steigerung der ROS-Produktion und der Rac-Aktivität kann durch Hemmung des EGF-Rezeptors verhindert werden (Seshiah *et al.*, 2002).

- **Src-Kinase**

Genauso scheint eine Angiotensin II induzierte ROS-Produktionssteigerung und Rac-Aktivierung durch Inhibition der Src-Kinase verhindert werden zu können. Diese Beobachtung geht konform mit älteren Studien über die Tyrosin-Kinase-abhängige Aktivierung der Oxidase (Sohn *et al.*, 2000, *Br. J. Pharmacol.*) und über die ROS abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Angiotensin II *via* Src (Ushio-Fukai *et al.*, 2002).

Faktoren, die zur Reduktion der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität führen

Über eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase waren bei Beginn unserer Arbeit wenige Faktoren bekannt. Ein möglicher NAD(P)H-Oxidase hemmender Signalstoff scheint das weibliche Hormon Östrogen zu sein.

Der arterioprotektive Effekt von Östrogen wurde anhand von verschiedenen Tiermodellen bereits ausführlich gezeigt und sowohl in epidemiologischen als auch in klinischen Studien an Frauen konkretisiert (Riedel *et al.*, 1993). Es gibt Hinweise dafür, dass der protektive Effekt des Östrogens durch einen Anstieg der lokalen NO-Konzentration vermittelt wird (Guetta *et al.*, 1997, Rubanyi *et al.*, 1997). Weiterhin finden sich Belege

dafür, dass Östrogen (17 β -Estradiol oder E2) das NO / O₂⁻ -Gleichgewicht in Endothelzellen durch Einfluss auf die NAD(P)H-Oxidase Aktivität bzw. Expression steuern kann.

So postulieren *Wagner et al.*, dass 17 β -Estradiol in physiologischen Konzentrationen in humanen Endothelzellen die Expression der gp91^{phox} Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase signifikant inhibiert. Aufgrund der verminderten gp91phox-Expression nach 17 β -Estradiol Behandlung, konnte die Phorbol ester-stimulierte Steigerung der O₂⁻ -Produktion verhindert werden (*Wagner et al.*, 2001).

Takeda-Matsubara *et al.* konnten in VSMC nachweisen, dass 17 β -Estradiol die Aktivität der SHP-1 steigert (*Takeda-Matsubara et al.*, 2002).

Dieser Aspekt gab uns einerseits einen weiteren Hinweis auf die potentielle zentrale Bedeutung der SHP-1 im Zusammenhang mit der Aktivierung / Deaktivierung der NAD(P)H-Oxidase, andererseits erhärtete es den Verdacht, dass 17 β -Estradiol ein Hemmstoff der NAD(P)H-Oxidase sein könnte.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit lagen somit zwar Hinweise für mögliche Regulationsmechanismen der endothelialen NAD(P)H-Oxidase durch Änderung der Tyrosinphosphorylierung vor, allerdings war unbekannt, in welcher Form Tyrosinphosphorylierungsschritte an der NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung beteiligt sind. Anhand zahlreicher Einzelbefunde, welche vornehmlich in nicht endothelialen Zellsystemen erhoben wurden, stellte sich allerdings vor allem die Frage, inwieweit Tyrosinphosphatasen und im Besonderen die SHP-1 für die Regulierung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase von Bedeutung sein könnten.

Die wichtigsten Signalwege zur Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch die SHP-1 könnten in diesem Zusammenhang über die PI3-K und Rac führen, bei denen Tyrosinphosphorylierungsschritte eine essentielle Rolle spielen.

B. Fragestellung

Ein Ungleichgewicht an Superoxidanionen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Endotheldysfunktion, die im weiteren Verlauf an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt ist. Als Hauptquelle von Sauerstoffradikalen in Endothelzellen gilt die NAD(P)H-Oxidase. Da eine unspezifische antioxidative Therapie mit Vitaminen nicht den gewünschten Erfolg zu erzielen scheint (Vivekananthan *et al.*, 2003), ergibt sich die Notwendigkeit der Aufklärung spezifischer Aktivierungsschritte der ROS-Bildung durch die NADPH Oxidase, um so neue und wirksame therapeutische Ansatzpunkte zu finden. Die Aufklärung von Signalwegen zur Bildung von Sauerstoffradikalen und dem Entstehen eines NO / ROS-Ungleichgewichtes ist von großem wissenschaftlichen und klinischen Interesse, da hieraus möglicherweise vasoprotektiv wirksame antioxidative Strategien entwickelt werden könnten

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Analyse der Rolle der Tyrosinphosphatase SHP-1 als einem wichtigen Regulationsschritt bei der Kontrolle der NADPH Oxidase Aktivität. Neben der Aufklärung potentialer Siganlwege, die durch SHP-1 in diesem Kontext beeinflusst werden, sollte untersucht werden, welche endothelialen Stimuli und Inhibitoren die SHP-1 beeinflussen.

Die Arbeit sollte dabei folgende Einzelfragen klären:

- (1) Gibt es in Endothelzellen eine SHP-1 und ist sie dort aktiv?**
- (2) Mit welchen Methoden lässt sich die endotheliale SHP-1 möglichst effektiv inhibieren?**
- (3) Kann durch Ausschaltung der SHP-1 die Bildung von Sauerstoffradikalen beeinflusst werden?**
- (4) Handelt es sich bei der NAD(P)H-Oxidase wirklich um die Hauptquelle von ROS und ist sie auch verantwortlich für die Steigerung der Sauerstoffradikalproduktion nach Hemmung der SHP-1?**

- (5) Ist die SHP-1 ein direkter Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase oder reduziert die SHP-1 die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase durch Dephosphorylierung der PI3-K?**
- (6) Wie aktiviert die PI3-K die NAD(P)H-Oxidase? Ist Rac 1 dabei involviert?**
- (7) Welche Aktivatoren und welche Hemmstoffe der SHP-1 gibt es und welche Rolle spielen dabei VEGF und Östrogen?**
- (8) Welche Rolle spielt die SHP-1 bei der Vermittlung von kardioprotektiven Signalen des Östrogens?**

C. Material und Methodik:

C.1. ZELLKULTUR

C.1.1. Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)

PBS ⁻	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ : 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Dispase	Dispase II, Konzentration 2,4 U/ml in PBS ⁻
HUVEC Medium	Medium 199 mit 20% Kälberserum und 20% <i>Endothelial Cell Growth Medium</i> (Promocell), 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

Um Humane Umbilikalvenenendothelzellen (*human umbilical venous endothelial cells* – HUVEC) zu kultivieren, wurden frische Umbilikalvenen (Länge ca. 10 – 15 cm) unter sterilen Bedingungen an beiden Venenenden kanüliert und mit sterilem PBS⁻ durchgespült. Im Anschluss daran wurde Dispase intraluminal in die Vene appliziert, die Kanülenenden mit einem 3-Wege-Hahn verschlossen, und die Vene 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Nach Spülung mit 50 ml Medium 199 wurden die abgelösten Endothelzellen mit dem Effluat in einem Laborröhrchen (50 ml Falcon von Fa. Becton Dickinson, Deutschland) aufgefangen. Die Zellen wurden 10 Minuten lang bei 500 g (Raumtemperatur) zentrifugiert, das Pellet in 10 ml HUVEC Medium resuspendiert, und in eine T25 Zellkulturflasche (Fa. Becton Dickinson, Deutschland) gefüllt.

C.1.2. Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

PBS ⁻ :	s. C. 1.1.
Trypsin / EDTA:	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA
HUVEC Medium:	s. C. 1.1.

Die Kultivierung der HUVEC fand in Zellkulturschalen in HUVEC Medium im Inkubator statt. Im Inkubator herrschten 37 ° C. Der mit Wasserdampf gesättigten Luft wurden 5% CO₂ beigemischt. Das Medium wurde täglich gewechselt. Bei Erreichen des Konfluenzstadiums (lückenloser Zellrasen) erfolgte die Subkultivierung. Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS⁻ 2 – 4 Minuten mit Trypsin bei 37° C inkubiert, durch mehrmaliges Klopfen abgelöst, und mit HUVEC Medium aufgenommen. Die im Verhältnis

1:2 bis 1:4 gesplitteten Zellen, wurden auf neue Zellkulturschalen verteilt. Es wurden nur Zellen der Passagen 1 – 3 verwendet.

C.1.3. Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)

PBS⁻: s. C. 1.1.

Trypsin / EDTA: s. C. 1.2.

HMEC Medium: Medium 199 mit 10% Kälberserum und 1% *Endothelial Cell Growth Medium*, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

Die Kultivierung und die Subkultivierung der HMEC erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bei den HUVEC (beschrieben unter Punkt 1.2.). Allerdings handelt es sich bei HMEC um eine immortalisierte Zelllinie (Xu *et al.*, 1994; Ades *et al.*, 1992), in welcher Versuche in der Subpassage 33 – 35 durchgeführt wurden.

C.2. MESSUNG VON O₂⁻ AN INTAKTEN HUVEC

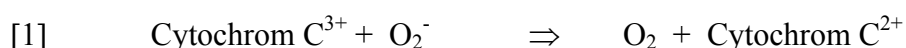
Hungermedium Medium 199 mit 1% Kälberserum, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Base* ohne L-Glutamin, ohne Phenolrot

Reaktionsansatz 40 µM Cytochrom C, 30 µM N Omega-Nitro-L-Arginin (L-NA) in DMEM-Medium

Vergleichsansatz 40 µM Cytochrom C, 30 µM L-NA, 200 U / ml SOD in DMEM-Medium

Die O₂⁻-Produktion wurde als derjenige Anteil der Cytochrom C-Reduktion bestimmt, der durch SOD inhibierbar war. Cytochrom C enthält Fe³⁺. Cytochrom C³⁺ liegt im Reaktionsgemisch als oxidierte Form (> 99,5%) vor und wird durch O₂⁻ zu Cytochrom C²⁺ reduziert [1].



Diese Reduktion bewirkt eine Absorptionszunahme, die photometrisch bei der Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden kann.

Da die Reduktion von Cytochrom C auch O_2^- unabhängig erfolgen kann (Tarpey *et* Fridovich, 2001), wird in einem Vergleichsansatz das Enzym Superoxiddismutase (SOD) beigegeben, um den O_2^- -abhängigen Anteil der Cytochrom C-Reaktion zu bestimmen. SOD katalysiert die Reaktion [2].



Die O_2^- spezifische Cytochrom C Reduktion ergibt sich somit aus der Differenz der Cytochrom C Reduktion im Reaktionsansatz ohne SOD und der Cytochrom C Reduktion im Vergleichsansatz mit SOD (Fridovich, 1985). Das entstehende H_2O_2 hatte dabei keinen Einfluss auf diesen SOD-hemmbareren Anteil, insofern als dass in unseren Kontrolluntersuchungen die Gabe von Katalase in den Vergleichsansatz mit SOD keinen Effekt auf die Extinktion zeigte. Die Absorptionsdifferenz (angegeben in sogenannten „*relative light units*“ (RLU)) kann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ($E_{550nm} = 2,1 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Massey, 1959; McCord *et* Fridovich, 1969)) in nmol O_2^- umgerechnet werden.

Verwendet wurden konfluente HUVEC in 24 Well Platten nach 24 Stunden auf Hungermedium. Sämtliche Messungen der endothelialen O_2^- -Produktion wurden unter Hemmung der endothelialen Synthase (eNOS) durchgeführt, da NO mit O_2^- zu $ONOO^-$ reagiert und so die Messung stören würde. Dafür wurden die HUVEC mit dem NOS Inhibitor L-NA (30 μM) 30 Minuten vorbehandelt. Zur O_2^- -Messung wurden sowohl dem Reaktionsansatz als auch dem Vergleichsansatz die Substanzen, deren Wirkung auf die endotheliale O_2^- -Produktion untersucht werden sollten in der jeweiligen Konzentration zugefügt. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Ansätzen (400 μl / Well (Durchmesser 1,8 cm)) für 30 Minuten überschichtet und anschließend im Überstand die Cytochrom C Reduktion photometrisch bestimmt.

C.3. MESSUNG DER NAD(P)H-OXIDASE AKTIVITÄT

Lysispuffer	20 mM monobasischer Kaliumphosphat Puffer, 1 mM EDTA
Reaktionsansatz	40 µM Cytochrom C in Lysispuffer
Vergleichsansatz	40 µM Cytochrom C, 200 U / ml SOD in Lysispuffer

Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase wurde anhand der NADH- oder NADPH-abhängigen O_2^- -Produktion bestimmt. Dazu wurden konfluente HUVEC in 6 Well Platten lysiert: Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ wurde mit 50 µl Lysispuffer pro Well 15 Minuten auf Eis inkubiert und die Zellen mit dem Zellscraper abgelöst. Die Zellsuspension wurde mittels viermaligem Ziehen durch eine 29 gauge Nadel zusätzlich mechanisch homogenisiert und 5 Minuten lang bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und im Überstand eine Proteinbestimmung (siehe Punkt C. 5.2.) durchgeführt. Es wurden jeweils 10 µg des Zelllysates in jeweils beide Absätze pipettiert (mit und ohne SOD) und die Extinktion gemessen. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von NADH oder NADPH (je 100 µM) gestartet und die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt (Prinzip der Cytochrom C Messmethode, siehe Punkt C. 2).

C.4. MESSUNG DER SHP-1 AKTIVITÄT

PBS ⁻	s. C. 1.1.
RIPA Puffer	Tris 20 mM, EDTA 1 mM, Pefablock 1 mM, Leupeptin 1 µM, Pepstatin 1 µM, Aprotinin 1 µM, Natriumfluorid 50 mM, Natriumpyrophosphat 40 mM, Natriumorthovanadat 2 mM, 1% Triton -X 100, 0,5% Desoxycholsäure (DOC), 0,1% Natrium Dodecylsulfat (SDS, <i>Sodium Dodecylsulfate</i>), pH 7,35
Phosphatasepuffer	Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl 5 mM, Mn Cl 5 mM pH 6,5
pNPP	p-Nitrophenylphosphat 10 mM
Erstantikörper	Anti-SHP-1 <i>rabbit</i> Antikörper (C-19, Santa Cruz, USA)

pNPP ist ein nicht spezifisches Substrat, das verwendet wird, um Protein-, alkalische und saure Phosphatasen zu untersuchen. Phosphatasen wie SHP-1 katalysieren die Hydrolyse von pNPP zu p-Nitrophenol, einem chromogenen Produkt mit einer Absorption bei 405 nm.

Konfluente HUVEC Zellkulturschalen (10 cm) wurden mit PBS⁻ gewaschen und in RIPA Puffer vollständig ablysiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder im Kühlraum bei 4° C (Inkubationen). Im Anschluß daran wurde die Zellsuspension mindestens viermal durch eine 29 gauge Nadel aufgezogen, um Proteinkomplexe zu zerstören. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 10000 g wurde der Überstand abgenommen und in diesem die Proteinmenge bestimmt. Eingesetzt wurden 300 µg Protein. Es erfolgte eine Präabsorption von unspezifischen Bindungen mit Protein A Pansorbin Beads (Calbiochem, Deutschland) für mindestens 45 Minuten, nach dem Abzentrifugieren der unspezifisch gebundenen Protein A Pansorbin Beads (10000 rpm, 1 Minute) wurden die Pellets verworfen. Die Überstände wurden für 1 – 2 Stunden mit dem Erstantikörper gegen SHP-1 auf dem Schüttler vorinkubiert, dann wurde Protein A dazugegeben und alles über Nacht auf dem Schüttler belassen. Das Waschen erfolgte über Säulen, die mit 10 µm Filtern (mobicols, MoBiTec, Deutschland) ausgestattet waren (Protein A adsorbiert an die Säulen und SHP-1 wird angereichert), fünfmal mit RIPA Puffer und fünfmal mit Phosphatase Puffer (Waschlösung verwerfen). Nach der Applikation von pNPP (100 µl, 10 mM) pro Säule wurden die Säulen bei 37° C eine Stunde lang inkubiert, die Lösungen (pNPP → p-Nitrophenol) auf Multiwellplatten (96 Well, 50 µl pro Well) übertragen und ihre Extinktion bei 405 nm mit einem Multiwellphotometer (SpectraFluor, Tecan, USA) gemessen.

C.5. Nachweis von Tyrosinphosphorylierungen der p 85 Untereinheit der PI3-K durch Immunopräzipitation

C.5.1. Zelllyse

PBS⁻ s. C. 1.1.

Lysispuffer 20 mM monobasisches Kaliumphosphat pH 7,0, 100 mM NaF, 15 mM Na₄P₂O₇, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 2 µg / ml Leupeptin, 2 µg / ml Pepstatin, 1% Triton

Verwendet wurden konfluente Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser), die nach dem Versuch zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen worden waren. Nach dem Waschen wurde mit 100 µl Lysispuffer 15 Minuten auf Eis inkubiert und mit dem Zellscraper abgelöst. Die Zellsuspension wurde mittels viermaligem Ziehen durch eine 29 gauge Nadel zusätzlich mechanisch homogenisiert und 5 Minuten lang bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und im Überstand eine Proteinbestimmung (s.u.) durchgeführt.

C.5.2. *Proteinbestimmung*

Nach Bradford 1976

Bradford Reagenz 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml 50% (v/v) Ethanol,
 100 ml 85% H₃PO₄ auf 1L H₂O

BSA Lösung 1 mg / ml (Rinderserumalbumin)

Der Bradford Assay wird benutzt, um den Proteingehalt einer Lösung zu bestimmen, indem die Absorption der unbekannten Lösung nach der chromogenen Reaktion mit dem Bradford Reagenz (595 nm) mit einer Standardreihe mit bekanntem Proteingehalt verglichen wird.

In einer Küvette wurden 690 µl H₂O, 200 µl Bradford Reagenz und 10 µl Zelllysate gegeben und die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe einer parallel erstellten Eichreihe mit 1 – 15 µg BSA / 900 µl Lösung konnte der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

C.5.3. *Immunopräzipitation von p85*

Eingesetzt wurden jeweils 300 µg Protein aus dem Zelllysate (Gewinnung siehe Punkt C. 4.). Um nun unspezifische Bindungen auszuschließen, erfolgte erst eine Präabsorption der unspezifischen Bindungen mit Pansorbin A *Beads* (10 µl pro 100 µg Protein) für 45 Minuten auf dem Schüttler bei 4° C, Zentrifugation (10000 rpm, 1 Minute) und Gewinnung des Überstands (siehe auch Punkt C. 4.). Dann wurde je 1 µl des Anti p85 Antikörpers zum Überstand appliziert, zwei Stunden auf dem Schüttler bei 4° C inkubiert und je 30 µl Pansorbin A *Beads* hinzugefügt. Die Ansätze wurden über Nacht auf dem Schüttler

belassen. Am nächsten Tag wurde fünfmal mit eiskaltem HUVEC-Lysispuffer gewaschen und zentrifugiert (10000 rpm, 1 Minute), um das an die Pansorbin A *Beads* gebundene p85 als Pellet für den folgenden Westernblot zu gewinnen (siehe Punkt C.5.4.). Der erste Überstand und der erste Waschüberstand wurde ebenfalls konserviert und als Kontrolle auf das Westernblotgel aufgetragen (siehe folgender Punkt).

C.5.4. *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)*

Nach Laemmli 1970, verändert

Acrylamid Lösung	40% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) Bisacrylamid
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl pH 8,8
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris HCl pH 6,8
2x Probenpuffer	0,125 M Tris HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,02% Bromphenolblau (w/v), 200 mM Mercaptoethanol
SDS	10% (w/v)
APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamid
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris HCl pH 8,5, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Die Gele dienen zur Auftrennung von Proteinen aufgrund des Reibungskoeffizienten und damit letztendlich nach ihrer Größe.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12% igen Polyacrylamid Trenngelen unter denaturierenden Bedingungen. Für zwei 12% ige Trenngele wurden 15 ml Acrylamidlösung, 21,8 ml H₂O und 12,5 ml Trenngelpuffer gut gemischt und für ca. 15 Minuten entgast. Nach der Entgasung wurden 500 µl 10% SDS, 250 µl APS und 25 µl TEMED hinzugegeben, nochmals gemischt und zwischen zwei durch 1 mm dicke Spacer getrennte Glasplatten gefüllt. Nach ca. 30 Minuten, unter Übersichtung mit H₂O gesättigtem Isobutanol, war dieser Ansatz auspolymerisiert. Anschließend wurde der Alkohol durch mehrmaliges Waschen mit H₂O gründlich entfernt und das, unter identischen Bedingungen wie das Trenngel hergestellte 4% ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Der Probenkamm wurde in das noch flüssige Gel gesteckt bis das Gel auspolymerisiert war. Bevor die Proben aufgetragen wurden, mussten die Pellets aus Punkt C.5.3. mit Hilfe des

reduzierenden Probenpuffers (Verhältnis 1:1) resuspendiert und bei 10minütigem Kochen bei 100° C denaturiert werden. Nach dem Auftragen der Proben mit einer Hamilton Nadel wurde die Elektrophorese im Elektrophoresepuffer bei einer Stromstärke von 65 mA über 3 Stunden ausgeführt. Sowohl der 1. Überstand als auch der 1. Waschüberstand wurden zur Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

C.5.5. *Semi-Dry-Blotting*

Nach Sambrook *et al.* 1989, verändert

Transferpuffer	39 mM Glycin, 48 mM Tris HCl pH 8,0, 0,037% (w/v) SDS, 10% (v/v) Methanol
----------------	--

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierzu wurden das Gel und die Membran für 10 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Filterpapier wurden glatt und luftblasenfrei auf eine Graphitanode gelegt, darauf die Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Lagen des mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapiers. Daraufhin wurde die Graphitkathode aufgelegt und bei einer Stromstärke von 0,8 mA / cm² Gelfläche die Proteine 1 Stunde lang auf die Membran transferiert.

C.5.6. *Nachweis von phosphoryliertem Tyrosin mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz*

Waschpuffer	50 mM Tris, ohne (Waschpuffer (1)) und mit 0,3% Tween (Waschpuffer (2)), pH 7,5
<i>Blocking</i> Puffer	3% Trockenmilch in 50 mM Tris pH 7,5
Luminollösung	100 mM Tris pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Coumarinsäure in H ₂ O
H ₂ O ₂ Lösung	100 mM Tris pH 8,5, 1,5% H ₂ O ₂ in H ₂ O
Erstantikörper	Anti-Phosphotyrosin (Maus): Upstate Biotechnology (Deutschland)

Zweitantikörper

Anti-Maus IgG: Calbiochem (Deutschland)

Nach dem Proteintransfer auf die Membranen erfolgte der Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu minimieren, wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch eine mindestens 30 minütige Inkubation mit *Blocking* Puffer bei Raumtemperatur und Schütteln blockiert. Danach wurde einmal mit Waschpuffer (1) 15 Minuten und daraufhin dreimal mit Waschpuffer (2) auch jeweils 15 Minuten auf dem Schüttler gewaschen und die Membran mit dem für das Protein spezifischen Antikörper (Erstantikörper: Anti-Phospho-Tyrosin 1µg / ml in Blocking Puffer bzw. 1:500 in Blocking Puffer) über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde auf die gleiche Weise wie nach dem Blocken mit Waschpuffer (1) und (2) jeweils 15 Minuten auf dem Schüttler gewaschen und mit dem passenden Zweitantikörper Anti Maus (1:10000 in *Blocking* Puffer) 2 Stunden lang inkubiert. Das Waschen erfolgte erneut nach dem gleichen Prinzip. Die vom Erstantikörper gebundenen Proteine auf der Membran konnten nun indirekt über den gebundenen Zweitantikörper mittels der Peroxidasereaktion detektiert werden. Dafür wurden auf die Membran Luminollösung und H₂O₂ im Verhältnis 1:1 gegeben und dann die Chemilumineszenzintensität durch Belichtung eines Röntgenfilms (15 Sekunden) registriert. Die Auswertung der Intensität der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm erfolgte durch ein digitales Visualisierungssystem (Gel-Doc 1000, Bio-Rad, Deutschland).

C.6. RAC 1-PULL-DOWN-ASSAY

Bei Rac1 handelt es sich wie bereits in der Einleitung erwähnt um eine GTPase, die in ihrer aktiven Form mit GTP beladen ist. Mit dem *Rac1-Pull-Down-Assay* besteht die Möglichkeit aktiviertes Rac1, also GTP-beladenes Rac1 nachzuweisen (Bassermann *et al.*, 2002).

Das Proteinfragment Pak ist ein spezifischer Bindungspartner von GTP-beladenem, aktiven Rac1. Pak selbst wird in diesem Assay als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) als Plasmid in Bakterien amplifiziert und exprimiert (Bassermann *et al.*, 2002). GST wiederum wird durch Glutathion Agarose *Beads* gebunden, da GST eine Bindungsstelle für reduziertes Glutathion besitzt (Sulphydrylgruppe). Die GST-Pak-Agarose-*Beads* können dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

C.6.1. Plasmidamplifikation

SOB-Medium	Tryptone 20 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 0,5 g, KCl (1 M) 2,5 ml, MgCl ₂ (1 M) 10 ml, ad 900 ml H ₂ O
SOC-Medium	SOB-Medium + Glucose (1 M) 20 ml
LB-Medium	Bacto Trypton 10 g, Hefe Extrakt 5 g, NaCl 5 g, Aqua bidest ad 1L, pH 7,5 (mit NaOH), Autoklavieren
GST	Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein

C.6.1.1. Transformation

Der Bakterienstamm XL1blue E.coli wurde mit Plasmiden (pGEX) transformiert, die cDNA enthielten, welche einerseits für GST-Pak oder andererseits für GST allein (Kontrolle) kodierte. Plasmide allgemein sind kleine, extrachromosomale, ringförmige und sich autonom vermehrende DNA-Moleküle, die in vielen Bakterien vorkommen. Außerdem beinhalteten die von uns verwendeten Plasmide ein Resistenzgen, gegen welches die Bakterien keine Resistenz aufwiesen. Dazu wurde die in TE-Puffer gelöste Plasmid-DNA (etwa 5 µg DNA in 90 µl TE-Puffer) auf je 50 µl kompetente Bakterien gegeben und gemischt. Eine Kontrolle ohne Plasmid wurde ebenfalls angefertigt. Weiterhin erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis, wobei die Plasmide in die Bakterien wandern und später eine 90 Sekunden dauernde Hitzeschockbehandlung bei 42° C. Hierbei schließt sich die Bakterienzellwand wieder.

C.6.1.2. Klonierung

Nach dem Hitzeschock wurde kurz auf Eis abgekühlt, in SOC-Medium eine Stunde bei 37° C inkubiert und zum Schluß auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgespatelt, um die transformierten Bakterienkulturen zu vermehren. Im nächsten Schritt wurde eine der Plasmid-enthaltenden Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium gemischt. Diese Kultur wurde über Nacht auf dem Schüttelinkubator inkubiert (Übernachtskultur = ÜNK), am nächsten Tag mit LB-Medium 1:10 weiterverdünnt auf 500 ml und erneut 1-2 Stunden auf dem Schüttler bei 37° C inkubiert.

C.6.1.3. Plasmidpräparation

Da zur Expression von GST-Pak bzw. GST das gereinigte Plasmid in andere Zellen transformiert werden wird (siehe nächster Punkt), muss zuerst das Plasmid gewonnen werden. Dazu wurde ein spezielles Plasmidpräparationskit verwendet, der die Bakterien lysiert und erreicht, dass chromosomale DNA und Proteine als Komplexe (z.B. mit SDS oder Kalium- und Natriumionen) an Zelltrümmern gebunden bleiben und so abzentrifugiert werden können. Um RNA zu zerstören wird eine RNase eingesetzt. Das gereinigte Plasmid bleibt dann im Überstand zur weiteren Verwendung übrig.

Zur Reinigung des in Bakterienkultur amplifizierten Plasmids wurde ein QIAGEN Plasmidpräparationskit verwendet (QIAGEN Maxi Kit, Deutschland), welches aus den Komponenten Puffer 1 – 3, Puffer QBT, Puffer QC, Puffer QF besteht.

Vor Beginn wurde die RNase A zu Puffer 1 gegeben (1 *vial per* Flasche), der Puffer 2 auf 37° C erwärmt und der Puffer 3, um ein Präzipitieren zu vermeiden, auf 4° C herabgekühlt. Verwendet wurden 400 ml der ÜNK, die 15 Minuten bei 4° C und 600 g zentrifugiert wurden, um die Bakterien zu sedimentieren. Der Überstand wurde komplett abgeschüttet. Die Resuspendierung erfolgte in 10 ml Puffer 1 (der bereits die RNase A enthielt), wobei sämtliche Klumpen durch auf- und abpipettieren homogenisiert wurden. Anschließend wurden 10 ml Puffer 2 hinzugefügt, die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde dabei viskös. Nun wurden 10 ml Puffer 3 (4° C) zugegeben, erneut vorsichtig geschüttelt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 20000 g und 4° C war die Plasmid DNA im Überstand enthalten. Dieser wurde abgenommen und 120 µl davon für ein Kontrollgel asserviert.

Im Anschluß daran wurden QIAGEN-Tips 500 durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT äquilibriert und der Rest des Überstandes hinzugefügt. Um die Effektivität der DNA-Bindung zu messen, wurden wiederum 120 µl des Durchflusses asserviert. Danach wurde entsprechend Firmenprotokoll zwei Mal mit Puffer QC gewaschen und 120 µl der Waschlösung für das Kontrollgel abgenommen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und in einem 30 ml Gefäß gesammelt. Danach erfolgte die Präzipitation mit 10,5 ml Isopropanol (0,7 vol%), Mischen und eine 30 minütige Zentrifugation bei 30000 g und 4° C. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das DNA-Pellet mit 5 ml Ethanol (70%) bei Raumtemperatur gewaschen. Nun wurde 10 Minuten lang bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet 10 Minuten lang bei

Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA in angemessenem Volumen TE -Puffer resuspendiert. Dabei wurden, um Strangbrüche zu vermeiden, die Wände nur vorsichtig gespült. Anschließend wurde die DNA-Konzentration durch UV-Spectrophotometrie und Gel kontrolliert.

C.6.2. Herstellung der GST-Pak-Beads

NETN Puffer NaCl 100 mM, Phenylmethylsulfonylfluorid 1 mM, Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5 % Nonidet P-40, Benzamidin 5 mM

Zur Expression des GST-Fusionsproteins wurden BCL21 kompetente Zellen (Invitrogen, Deutschland) wie unter Punkt 7.1.1. beschrieben mit dem amplifizierten Plasmid transformiert, selektiert und wie unter Punkt 7.1.2. beschrieben auf selektiven LB - Platten kloniert. Danach wurden einzelne Kolonien in 5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum (Ampicillin) angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37° C inkubiert. Die ÜNK wurde am nächsten Tag zu 45 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ bei 37° C schüttelnd inkubiert. War die gewünschte OD erreicht, wurde zu 40 ml der Kultur IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM zugesetzt und weitere 4 Stunden bei 37° C schüttelnd inkubiert. Die restlichen 10 ml der Kultur wurden für weitere Versuche als Glykostocks aufbewahrt. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm; 10 Minuten; 4° C) sedimentiert und der Überstand verworfen.

Die Lyse erfolgte auf Eis durch Zugabe von 5 ml NETN, Lysozym in einer Endkonzentration von 100 µg / ml und durch Sonifizieren. Nach dem Ultraschallbad wurde 20 Minuten lang bei 14000 g und 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit Glutathion-Agarose-Beads (Amersham Biosciences, Deutschland) für 60 Minuten bei 4° C auf dem Schüttelrad inkubiert, 4 mal mit NETN-Puffer gewaschen und die Prozedur durch SDS-Page kontrolliert. Durch die Inkubation mit den Glutathion-Agarose-Beads bindet GST-Pak wie bereits oben erwähnt das Glutathion der mit selbigem beladenen Agarose Beads. Nach dem Reinigen mit NETN Puffer standen die fertigen GST-Pak-Glutathion-Agarose-Beads für den *Rac1-Pull-Down-Assay* zur Verfügung.

C.6.3. *Rac 1-Pull-Down-Assay*

Lysispuffer Rac	HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, 1% NP-40 (100%), MgCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mM, EDTA 1 mM, 10% Glycerol (100%), Pepstatin 1 µM, Leupeptin 1 µM, Aprotinin 1 µM, pH 7,5
PBS ⁻	s. C. 1. 1.

C.6.3.1. Zelllyse

Konfluente HMEC Zellkulturschalen (10 cm) wurden mit warmen PBS⁻ gewaschen, in Rac-Lysispuffer lysiert, mit dem Gummischaber abgekratzt, in Eppendorfgefäßen aufgefangen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

C.6.3.2. Bindung an GST-Pak-Beads

Das Auftauen der lysierten Proben erfolgte auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000g und 4° C. 30 µl des Totallysates wurden direkt mit 4x Laufpuffer versetzt und auf ein vorbereitetes 12% Acrylamidgel aufgetragen. Weitere 500 µl des Totallysates wurden mit je 30 µl der GST-Pak-Agarose-*Beads* (Herstellung s. C. 6. 1. und C. 6. 2.) versetzt und 45 Minuten auf dem Schüttelrad bei 4° C inkubiert. Im Anschluß daran wurde 30 Sekunden bei 10000g zentrifugiert und dreimal mit Rac-Lysispuffer gewaschen. Durch die Inkubation mit den GST-Pak-Agarose-*Beads* bindet Pak GTP-beladenes Rac1 aus den Proben. SDS-Page und Westernblotting ermöglichen im Anschluss die Detektion der GTP-Rac 1 Banden.

C.6.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Vorbereitung der Proben für den Western-Blot erfolgte durch Zugabe von Laufpuffer, 5 minütiges Kochen und Zentrifugieren, um die Agarose-*Beads* abzutrennen und zu sedimentieren. Danach wurden die Ansätze zu dem Totallysat auf das 12% Acrylamidgel aufgetragen. Der SDS-Page wurde wie unter Punkt 6.4. beschrieben durchgeführt, das Blotten erfolgte durch die Wet-Blot-Methode auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen, die im nächsten Punkt erläutert wird.

C.6.3.4. Wet-Blotting

Transferpuffer 10x Glycin 144 g, Tris 30 g, SDS 10 g, H₂O ad 1000 ml

Verdünnung 1:10 mit H₂O + 20% (v/v) Methanol

Das Wet-Blotten erfolgte in einem Tank auf PVDF-Membranen. Zum Äquilibrieren wurde die Membran kurz in 100% Methanol gelegt, anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Transferpuffer inkubiert und bis zum Gebrauch in Transferpuffer feucht gehalten. Das *Sandwich* wurde wie folgt zusammengebaut: Kathode / Filterpapier / Gel / PVDF-Membran / Filterpapier / Anode. Der Transfer erfolgte konstant für 20 Minuten bei 350 mA / maximale Spannung im mit Transferpuffer gefüllten Tank.

C.6.3.5. Nachweis von Rac 1 mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz

Der Nachweis von Rac erfolgt wie unter Punkt 6.5. beschrieben mittels Westernblotting und Visualisierung durch Chemilumineszenz. Als Erstantikörper wurde Rac1 *Rabbit* (polyklonal) Antikörper (Upstate Biotechnology, Deutschland) als Zweitantikörper der Anti *Rabbit* Antikörper (Santa Cruz, USA) verwendet.

C.7. Immunofluoreszenz

PBS⁺ Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺: 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

Hungermedium s. C. 2

Blocking Puffer s. C. 5.5

Erstantikörper Polyklonaler Rac 1 Antikörper (*Rabbit*, Santa Cruz, USA)
Anti-gp 91phox Antikörper (*Goat*, Santa Cruz, USA)

Zweitantikörper Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor, Molecular Probes, the Netherlands)
Anti-Goat IgG (Alexa Fluor, Molecular Probes, the Netherlands)

HMEC wurden bis zum Konfluenzstadium auf Kollagen-beschichteten *Coverslips* gezogen und 24 Stunden lang auf Hungermedium gesetzt bevor die Experimente durchgeführt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen und in 2 – 3% Formalinlösung fixiert. Im nächsten Schritt erfolgte nach erneutem Waschen mit PBS⁺ das Permeabilisieren der Zellen für 2 Minuten mit 0,2% Triton X-100 in PBS⁺. Danach wurde dreimal mit PBS⁺ gewaschen, 10 Minuten in Blocking Puffer auf dem Schüttler geblockt und 45 Minuten lang mit dem jeweiligen Erstantikörper (1:100 in PBS⁺) inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS⁺, eine 30 minütige Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper und erneut dreimaliges Waschen mit PBS⁺. Am Ende wurde das Medium abgesaugt, ein Tropfen *Mounting Medium* für konfokale Lasermikroskope zugegeben und die konfluente Zellschicht mit einem Deckglas verschlossen. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 410 Invert, Zeiss, Deutschland) aufgenommen, wobei ein Pinhole von 20 µm verwendet wurde.

C.8. Hemmung der SHP-1

C.8.1. Pharmakologische Inhibition der SHP-1

Als pharmakologischer Inhibitor der SHP-1 wurde Natrium Stibogluconat (englisch „*Sodium Stibogluconat*“, SG) verwendet, welches klinisch auch als Medikament gegen Leishmaniose eingesetzt wird (Mahmoud *et* Warren 1977). Die SHP-1 Phosphatase Aktivität wird durch SG in einer Konzentration von 10 ng/ml fast vollständig gehemmt. Dies entspricht ungefähr der Serumkonzentration bei der Behandlung der Leishmaniose (Mahmoud *et* Warren, 1977). SG bildet stabile Komplexe mit der SHP-1, indem es deren katalytische Untereinheit bindet. Ab 100 ng/ml verliert SG die Spezifität für SHP-1, es werden auch die SHP-2 und die PTP1B ebenfalls nahezu vollständig inhibiert (Pathak *et* Yi, 2001).

C.8.2. Posttranskriptionelles Gene Silencing

C.8.2.1. Oligonukleotide

Oligonukleotide:

(5' → 3') cccttatttactactttcgc: *random* Oligonukleotidsequenz

(5'→3') ccttgagcaggggtctctgcatcc: SHP-1 Antisense Oligonukleotidsequenz

Si RNA: (hier ist jeweils nur 5'→3' angegeben, der Doppelstrang ergibt sich aus den zugehörigen Basenpaaren Adenin + Thymin (Uracil); Guanin + Cytosin):

(5'→3') guccguguugguugcagcutt

(5'→3') uucuuucgaacgugucagcutt (Kontrolle)

(Krötz *et al.*, 2003, *Mol. Ther.*)

C.8.2.2. Magnetofektionsmethode

Als weitere Methode zur Hemmung der SHP-1, wurde die Antisense Oligonukleotid Transfektion verwendet. Dabei wird DNA in eine Zelle eingebracht, die im Zytosol an die komplementäre mRNA bindet und einen Doppelstrang bildet. Dadurch kann das Signal der mRNA nicht mehr abgelesen werden und RNAsen bauen den Doppelstrang ab. Dieses Prinzip stößt in der Praxis nach herkömmlichen Methoden schnell an seine Grenzen: Die physiologischen Barrieren wie Zellwand etc. erschweren das Eindringen der DNA in die Zelle, des Weiteren bedeuten die Transfektionsreagenzien einen hohen Stress für die Zelle und stellen damit die Hauptursache für die hohe Zytotoxizität dar. Aus diesen Gründen resultiert häufig eine relativ geringe Transfereffizienz.

Deshalb wurde von uns die Methode der **Magnetofektion** verwendet:

Dabei werden im Transfektionsansatz magnetische Nanopartikel an die Oligonukleotide gebunden. Diese Magnetpartikel besitzen einen Polyethylen Imin (PEI) Mantel, der positiv geladen ist. Dadurch können diese Partikel die durch die Phosphate negativ geladenen Nukleinsäuren binden, und durch gezielten Aufbau eines magnetischen Feldes (Magnetplatte) werden die Magnetpartikelgebundenen DNA-Partikel auf die Zelloberfläche gezogen (Plank *et al.*, 2003, *Expert. Opin. Biol. Ther.*; Plank *et al.*, 2003, *Biol. Chem.*; Krötz *et al.*, 2003, *Mol. Ther.*; Krötz *et al.*, 2003, *J. Vasc. Res.*). Verwendet wird die doppelte Menge an Magnetpartikeln als an Oligonukleotiden, um möglichst alle DNA-Partikel zu binden. Die Vorteile einer Magnetofektion bestehen in der deutlich kürzeren Dauer der Transfektion an sich und der daraus resultierenden deutlich geringeren Zytotoxizität. Außerdem wird durch Kombination der Magnetofektion mit dem Effectene-Transfektions-Kit (Qiagen, Deutschland) in HUVEC eine signifikant höhere Transfektions-Effizienz (90%) erreicht im Vergleich zur Standard Transfektion (30% Effizienz). Nicht

zuletzt kann bei der Magnetofektion an Oligonukleotiden und Transfektionsreagenz gespart werden und gezielt lokal transfiziert werden. Auch die Transfektion in vivo wird durch die Magnetofektion möglich (Krötz *et al.*, 2003, *Mol. Ther.*; Krötz *et al.*, 2003, *J. Vasc. Res.*, Plank *et al.*, 2003, *Expert. Opin. Biol. Ther.*; Plank *et al.*, 2003, *Biol. Chem.*).

C.8.2.3. Antisense Oligonukleotid Magnetofektion

Hungermedium s. C. 2

PBS⁺ s. C. 7

Zur Magnetofektion wurde ein Effektene Transfektionskit (Qiagen, Deutschland) verwendet, der auf folgende Weise modifiziert wurde:

Der Ansatz gilt für ein Well einer 24 Well Platte, 0,4 µl DNA entsprechen 400 ng Oligonukleotiden. Im Versuch wurden je einem Ansatz SHP-1 Antisense Oligonukleotiden ein Nonsense Ansatz gegenübergestellt.

1	DNA	0,4 µl
2	Buffer	26,4 µl
3	Enhancer	3,2 µl
4	Magnetpartikel	0,8 µl
5	Effektene	4,0 µl
6	Medium ad 200µl	165,2 µl

1 bis 4 wurden der Reihe nach zusammenpipettiert, 1 Sekunde gevortext und 2 – 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5 hinzugefügt, 10 Sekunden gevortext und 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation, erfolgte die Vorbereitung der 24 Well Platten. In jedes Well wurden jeweils 200 µl Hungermedium pipettiert. Dann wurde 6 zum Transfektionsansatz dazugegeben, vermischt und jeweils 200 µl des Ansatzes pro Well vorsichtig mit einer Pipette möglichst gleichmäßig aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten lang auf einer speziell für die 24 Well Platte hergestellten Magnetplatte im Brutschrank bei 37° C. Im Anschluß an die Inkubation wurde dreimal mit PBS⁺ gewaschen und frisches Hungermedium hinzugefügt. Erst 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Versuche durchgeführt.

C.8.2.4. RNA Interferenz

RNAi (RNA Interferenz) ist ähnlich wie die Verwendung von Antisense Oligonukleotiden ein posttranskriptioneller *Silencing*-Mechanismus, der unter physiologischen Bedingungen bei vielen Organismen von Pflanzen über Pilze (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) bis hin zu Säugern zu finden ist. Der Abbau der mRNA eines Zielproteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinmenge wird durch sogenannte „*small interfering RNAs*“, kurz siRNAs, von 21 Nukleotiden (nt) Länge vermittelt, deren Enden überlappen. Zu wissenschaftlichen Zwecken können chemisch synthetisierte, 21 nt lange RNA-Stücke oder siRNA-kodierende Plasmide benutzt werden (Moss, 2001; Fire *et al.*, 1998; 7, Zamore *et al.*, 2000; Hammond, 2000).

Für unsere Versuche wurde wieder die Methode der Magnetofektion nach dem unter C.8.2. beschriebenen Prinzip verwendet. Eingesetzt wurde die siRNA in der Endkonzentration von 100 nM nach folgendem Ansatz (1 Well einer 24 Well Platte):

1	RNA	2,0 µl
2	Buffer	8,0 µl
3	Enhancer	16,0 µl
4	Magnetpartikel	4,0 µl
5	Effectene	20,0 µl
6	Medium ad 200 µl	150,0 µl

Das Pipettieren erfolgte nach dem gleichen Schema wie unter Punkt C.9.2. beschrieben, genauso wie die Inkubation auf der Magnetplatte, das Waschen und das Überführen auf Hungermedium. Die Messungen fanden nach 24 Stunden statt.

C.9. STATISTISCHE ANALYSEN

Die Daten aller Experimente werden deskriptiv als Mittelwerte plus / minus Standardabweichung dargestellt.

Innerhalb einer Versuchsreihe waren alle Ergebnisse normal verteilt (die verwendete Software Sigma Stat[®] untersucht die Normalverteilung anhand des Kolmogorow-Smirnov-Tests).

Die statistische Analyse bei dem Vergleich zweier normalverteilter voneinander unabhängiger Gruppen wurde mittels t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, mehrere normalverteilte Gruppen wurden mittels ANOVA („*analysis of variance*“) miteinander verglichen. Als post hoc Test wurde die Methode nach Dunn angewendet.

Für gepaarte Experimente wurde der t-Test für verbundene Stichproben verwendet (Software für alle Tests: Sigma Stat[®]).

Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Balken- oder Liniendiagrammen mit Hilfe des Programmes Sigma Plot[®].

D. Ergebnisse

D.1. SHP-1 EXPRESSION IN HUVEC

Zu Beginn sollte geklärt werden, ob die SHP-1 in Endothelzellen vorhanden ist, basal aktiv ist und ob sie durch pharmakologische Inhibition und durch SHP-1 Antisense Magnetofektion vorübergehend ausgeschaltet werden kann.

D.1.1. *Proteinnachweis der SHP-1 in HUVEC-Lysaten mittels Westernblot*

Nach Immunopräzipitation und Nachweis des SHP-1-Proteins durch Westernblot in unbehandelten HUVEC-Zelllysaten konnte nachgewiesen werden, dass die SHP-1 Bande in Zelllysaten, die mit SHP-1 Antisense behandelt worden waren, nicht mehr vorhanden war (24h vorher für 15 Minuten; n = 4). Nach *Random* Magnetofektion konnte unter selben Versuchsbedingungen dieser Effekt nicht festgestellt werden.

IP: SHP – 1 – Protein

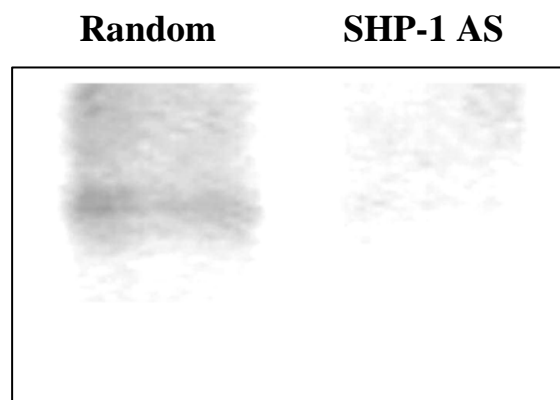


Abbildung 3: SHP-1 in HUVEC

Westernblot nach Immunopräzipitation von SHP-1 nach *Random* Magnetofektion und nach Ausschaltung der SHP-1 durch SHP-1 Antisense Magnetofektion. Der Westernblot zeigte eine Kontrollbande der SHP-1 nach *Random* Magnetofektion. Nach SHP-1 Antisense Magnetofektion war keine Bande zu sehen.

D.1.2. Nachweis der SHP-1 Aktivität in HUVEC und Ausschaltung ihrer Aktivität nach Antisense Magnetofektion

Messung der SHP-1 Aktivität in HUVEC zeigte, dass in diesen Zellen unter unseren Kulturbedingungen bereits vor Behandlung ($0,162 \pm 0,01$ RLU (s. C.2.)/mg Protein, hier nicht gezeigt, siehe Abb. 19) und nach *Random* Magnetofektion ($0,173 \pm 0,022$ RLU/mg Protein) eine Aktivität der SHP-1 vorhanden war. Nach SHP-1 Antisense Magnetofektion und nach Behandlung mit SG ($10\mu\text{M}$; 30 Minuten) wurde die SHP-1 Aktivität signifikant gesenkt ($0,005 \pm 0,004$ bzw. $0,06 \pm 0,017$ RLU/mg Protein). Antisense-Behandlung reduzierte die SHP-1 Aktivität sogar gegen Null. Gezeigt ist der pNPP (p-Nitrophenylphosphat)-Umsatz nach Immunopräzipitation von SHP-1 in RLU/mg Protein ($n = 3$; $p < 0,01$). Magnetofektion wurde in allen Versuchen 15 Minuten lang durchgeführt, Versuche mit transfizierten Zellen wurden 24 Stunden nach Beendigung der Magnetofektion vorgenommen, dies gilt auch für alle folgenden Experimente (s. C.8.2.).

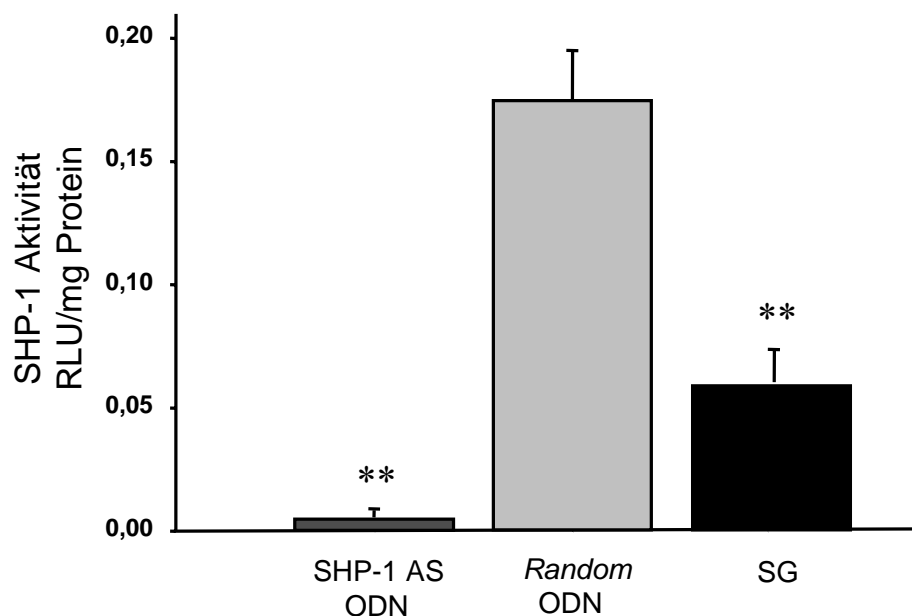


Abbildung 4: SHP-1 Aktivität in HUVEC

Messung der SHP-1 Aktivität mit dem Phosphatase Assay nach SHP-1-AS (Antisense) ODN („oligodeoxynucleotide“) Magnetofektion, nach *Random* Magnetofektion und nach Behandlung mit SG. Die Daten zeigen eine signifikant reduzierte Aktivität der SHP-1 nach SHP-AS Magnetofektion und nach Behandlung mit SG im Vergleich zur *Random* Magnetofektion. **: signifikant unterschiedlich vs. *Random*: $p < 0,01$.

D.2. ENDOTHELIALE SUPEROXIDRADIKALBILDUNG NACH HEMMUNG DER SHP-1 DURCH SG

D.2.1. Dosisreihe

In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass eine Hemmung der SHP-1 mit SG (10 ng/ml, 30 Minuten) zu einer signifikant gesteigerten O_2^- -Freisetzung ($0,077 \pm 0,006$ RLU) im Vergleich zu unseren Kulturbedingungen ($0,048 \pm 0,005$ RLU) führt. Da SG aber nur in niedrigeren Dosen ein spezifischer Hemmer der SHP-1 ist, wurde die O_2^- -Freisetzung unter Vorbehandlung von HUVEC mit verschiedenen Dosen von SG gemessen. In den Experimenten konnte eine signifikante Zunahme der O_2^- -Freisetzung nach SG 10 ng/ml nach 30 Minuten beobachtet werden. In höheren Konzentrationen nahm die O_2^- -Bildung stark ab ($0,043 \pm 0,003$ RLU mit 50 ng/ml bzw. $0,04 \pm 0,001$ RLU mit 100 ng/ml; jeweils 30 Minuten Inkubation; $n = 18$ für alle Ansätze; $p < 0,01$)

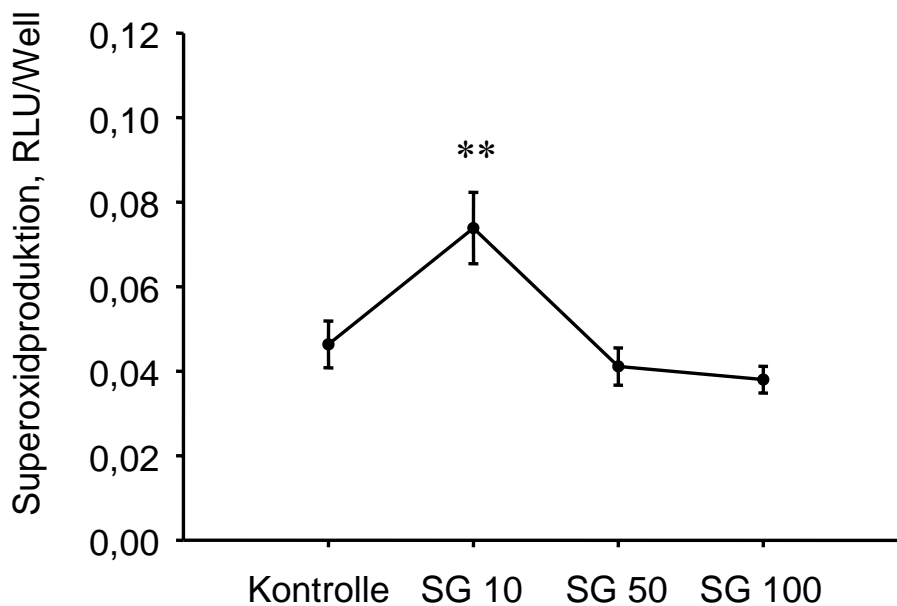


Abbildung 5: Dosisreihe SG

Die O_2^- -Freisetzung wurde mit der Cytochrom C Methode in HUVEC nach Behandlung mit SG in verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100 ng/ml) nach 30 Minuten Inkubation gemessen. Die größte O_2^- -Freisetzung konnte bei einer Konzentration von 10 ng/ml SG beobachtet werden. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$.

D.2.2. Zeitreihe

Anhand einer Zeitreihe sollte nun die optimale Inkubationszeit für SG 10 ng/ml ermittelt werden. Nach 30 Minuten konnte die stärkste Zunahme der O_2^- -Freisetzung ($0,066 \pm 0,005$ RLU) im Vergleich zu unseren Kulturbedingungen ($0,041 \pm 0,006$ RLU) bzw. nach 5 minütiger Inkubation ($0,034 \pm 0,001$ RLU) beobachtet werden. Nach 60 Minuten Inkubationszeit konnte die O_2^- -Freisetzung im Vergleich zum 30 Minuten Wert nicht mehr signifikant gesteigert werden ($0,077 \pm 0,007$ RLU; $n = 12$ für alle Zeitpunkte, $p < 0,01$). Aufgrund der Ergebnisse aus Dosis- und Zeitreihe wurde in allen folgenden Versuchen SG in einer Konzentration von 10 ng/ml und einer Inkubationsdauer von 30 Minuten eingesetzt.

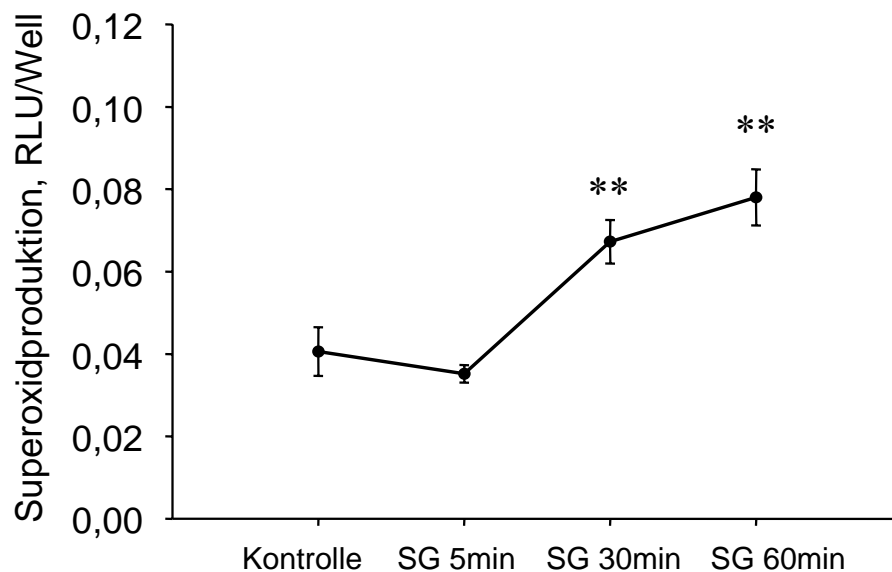


Abbildung 6: Zeitreihe SG

Die O_2^- -Freisetzung wurde mit der Cytochrom C Methode in HUVEC nach Behandlung mit SG 10 ng/ml nach verschiedenen Inkubationszeiten (5, 30, 60 Minuten) gemessen. Die O_2^- -Freisetzung erreichte nach 30 Minuten einen Höchstwert, der sich auch nach längeren Inkubationen nicht mehr signifikant steigern ließ.

** : signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$.

D.3. ENDOTHELIALE O_2^- -BILDUNG NACH HEMMUNG DER SHP-1 DURCH POSTTRANSKRIPTIONELLES GENE SILENCING

In den vorhergehenden Versuchen wurde beobachtet, dass die O_2^- -Freisetzung durch Hemmung der SHP-1 signifikant gesteigert werden konnte. In weiterführenden Versuchen wurde nun in HUVEC die SHP-1 nicht nur mit SG, sondern auch mit SHP-1 Antisense Magnetofektion und mit RNAi blockiert. Posttranskriptionelle Proteindegradierung mit SHP-1 Antisense Behandlung ($0,108 \pm 0,011$ RLU; $n = 24$; $p < 0,01$) steigerte die O_2^- -Bildung noch stärker als SG-Inkubation ($0,071 \pm 0,007$ RLU; $n = 24$; $p < 0,01$) im Vergleich zu Kulturbedingungen ($0,041 \pm 0,004$ RLU; $n = 40$) und *Random* Magnetofektion ($0,044 \pm 0,006$ RLU; $n = 24$). Ähnliche Ergebnisse wie mit SHP-1 Antisense Behandlung wurden durch Magnetofektion von siRNA gegen SHP-1 (15-minütige Magnetofektion) erreicht ($0,105 \pm 0,019$ RLU; $n = 8$; $p < 0,01$).

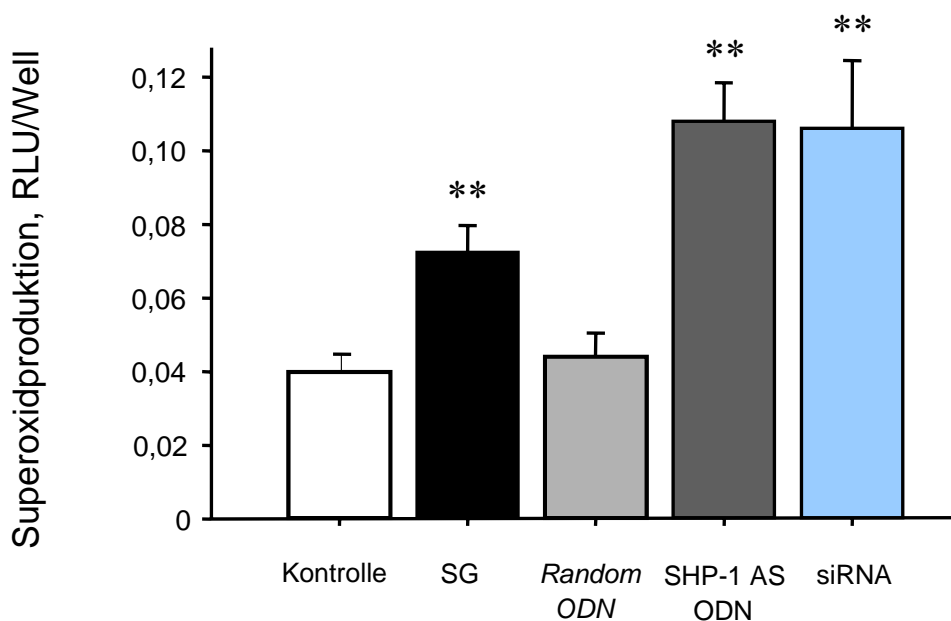


Abbildung 7: Verminderung der SHP-1 Aktivität steigerte die endotheliale O_2^- -Produktion.

Messung der O_2^- -Freisetzung in HUVEC mit der Cytochrom C Methode nach Hemmung der SHP-1 mit SG; SHP-1 AS ODN Magnetofektion und mit RNAi-Magnetofektion. Das Diagramm zeigt in allen Fällen eine signifikante Steigerung der O_2^- -Freisetzung. **: signifikant unterschiedlich vs Kontrolle: $p < 0,01$.

D.4. NAD(P)H-OXIDASE AKTIVITÄT IN ENDOTHELZELLEN (HUVEC) NACH HEMMUNG DER SHP-1

Die NAD(P)H-Oxidase ist bekanntermaßen die Hauptquelle für die basale Sauerstoffradikalproduktion in Endothelzellen. In weiterführenden Versuchen sollte nun geprüft werden, ob die NAD(P)H-Oxidase auch für die Steigerung der O_2^- -Freisetzung nach Hemmung der SHP-1 verantwortlich ist. Von Interesse war zu diesem Zeitpunkt auch, wie sich die Behandlung mit NAC (N-Acetylcystein), einem Radikalfänger, auf die O_2^- -Formation auswirken würde

D.4.1. Ausschaltung von anderen Radikalbildnern – Auswirkung auf die Radikalformation nach Hemmung der SHP – 1

Zunächst erfolgte in neuen Sauerstoffradikalmessungen die Inhibition verschiedener anderer möglicher enzymatischer O_2^- -Quellen in Anwesenheit von SG. Zur Inhibition der Xanthinoxidase wurde Oxypurinol (Ox; 300 μ mol/L; n = 4), von CYP2C9 Sulfaphenazol (Sulfa; 50 μ mol/L; n = 3) und der Cyclooxygenase Indomethazin (Indo; 20 μ mol/L; n = 3) verwendet. Unabhängig von der Hemmung der Xanthinoxidase, von CYP2C9 und der Cyclooxygenase konnte eine SG induzierte Steigerung der O_2^- -Freisetzung im Vergleich zu Kulturbedingungen (0,06 +/- 0,006 RLU) beobachtet werden (0,109 +/- 0,006 RLU; 0,110 +/- 0,016 RLU; 0,084 +/- 0,026 RLU). Nach der Behandlung mit dem Antioxidans NAC (N-Acetylcystein) (1 mmol/L) konnte die O_2^- -Menge trotz SG Behandlung auf kaum nachweisbare Werte gesenkt werden (0,009 +/- 0,002, n = 4; p < 0,01).

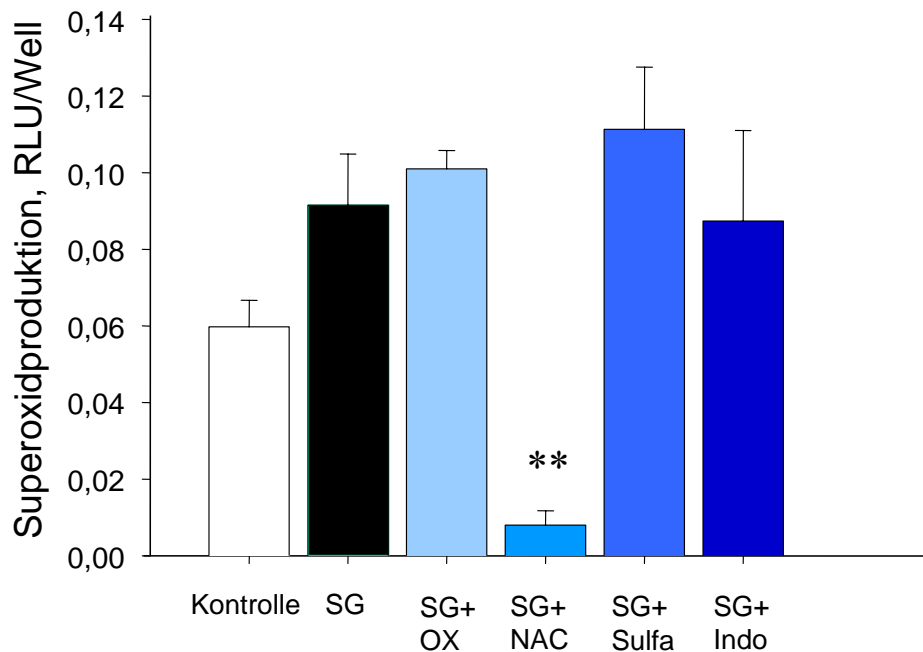


Abbildung 8: Hemmung verschiedener Radikalbildner in Anwesenheit von SG

Messung der O_2^- -Freisetzung in HUVEC mit der Cytochrom C Methode nach Hemmung verschiedener Radikalbildner in Anwesenheit von SG. Xanthinoxidase (Oxypurinol (Ox)), CYP2C9 (Sulfaphenazol (Sulfa)) und Cyclooxygenase (Indomethazin (Indo)) beeinflussten die Steigerung der O_2^- -Freisetzung nach SG Behandlung nicht. NAC (N-Acetylcystein) reduzierte die O_2^- -Formation erheblich. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$.

D.4.2 Inhibition der NAD(P)H-Oxidase – Auswirkung auf die Radikalformation nach Hemmung der SHP-1

Eine direkte Inhibition der NAD(P)H-Oxidase erfolgte in konfluenten HUVEC 24 Well Platten durch das Peptid gp91 *ds-tat* (100 $\mu\text{mol/L}$; 30 Minuten), welches spezifisch die katalytische gp91^{phox} Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase hemmt. Eine Steigerung der Sauerstoffradikalproduktion durch Hemmung der SHP-1 mit SG (0,07 \pm 0,003 RLU; $n = 12$; $p < 0,01$ vs. Kontrolle) im Vergleich zu Kulturbedingungen (0,038 \pm 0,007 RLU; $n = 9$) konnte nach Blockade der NAD(P)H-Oxidase auf diese Weise nicht mehr beobachtet werden (0,037 \pm 0,005 RLU; $n = 9$; $p < 0,01$ vs. SG). Dieser Effekt zeigte sich nicht nach der Verwendung des *scrambled-tat* Peptides (0,058 \pm 0,005 RLU; $n = 9$; $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

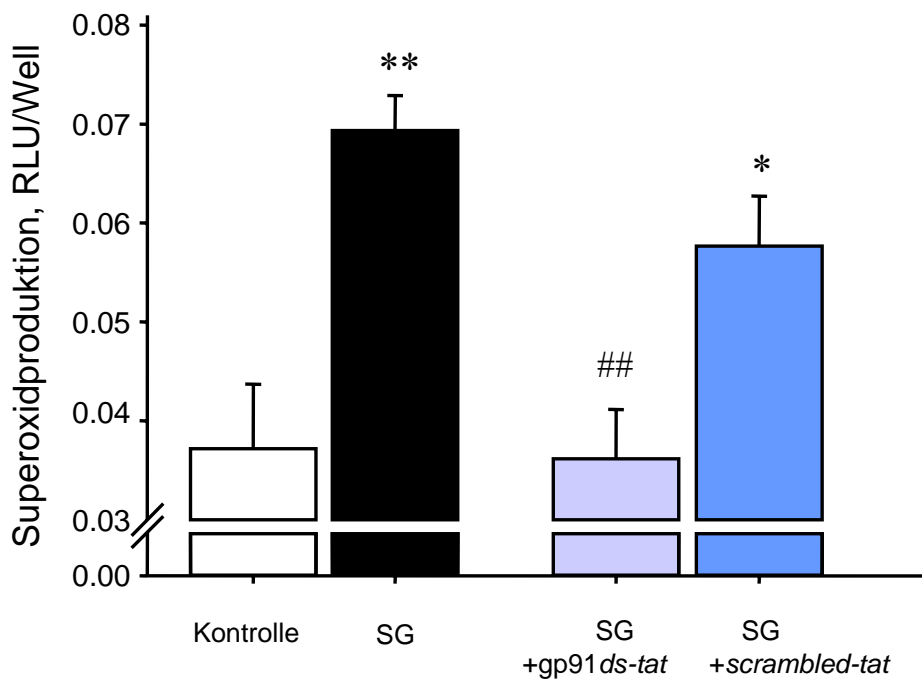


Abbildung 9: Hemmung der SHP-1 steigert die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase .

Messung der O_2^- -Freisetzung in HUVEC mit der Cytochrom C Methode in Anwesenheit von SG und nach Hemmung der NAD(P)H-Oxidase mit gp91 *ds-tat*. Das spezifische inhibitorische Peptid der NAD(P)H-Oxidase (gp91 *ds-tat*) konnte die Steigerung der Sauerstoffradikalfreisetzung vermittelt durch die Hemmung der SHP-1 mit SG verhindern. */**: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$; ##: signifikant unterschiedlich vs. SG: $p < 0,01$.

D.4.3. NAD(P)H-Oxidase Aktivität nach Hemmung der SHP-1

Eine Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase Aktivität durch Messung der NADH-abhängigen Sauerstoffradikalproduktion in HUVEC Lysaten konnte zeigen, dass eine SHP-1 Antisense Magnetofektion ($2,248 \pm 0,24 \text{ nmol } O_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; $p < 0,01$) die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase im Vergleich zu Kulturbedingungen ($0,667 \pm 0,187 \text{ nmol } O_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) und zur *Random* Magnetofektion ($0,661 \pm 0,169 \text{ nmol } O_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) um das 3,3-fache erhöht (alle Ansätze $n = 24$).

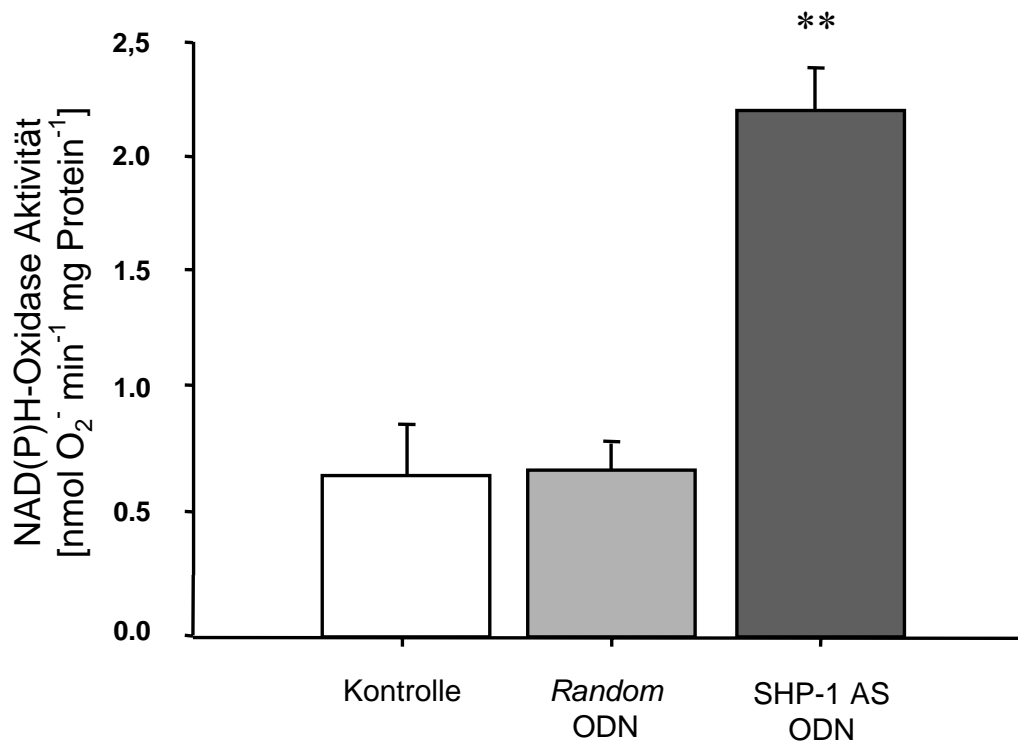


Abbildung 10: Hemmung der SHP-1 steigerte die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase.

Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase Aktivität mittels Messung der NAD(P)H-abhängigen Sauerstoffradikalproduktion in HUVEC. Die O₂⁻-Freisetzung konnte durch SHP-1 Antisense Magnetofektion im Gegensatz zur *Random* Magnetofektion gesteigert werden. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$.

D.5. MECHANISMUS DER NAD(P)H-OXIDASE-INKTIVIERUNG DURCH SHP-1

D.5.1. Rolle der PI3-Kinase bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase nach Hemmung der SHP-1 in HUVEC

Eine Hemmung der PI3 Kinase in HUVEC Monolayern (24 Well Platten) erfolgte durch Wortmannin (10 nmol / L; 30 Minuten), seinen spezifischen pharmakologische Inhibitor. Nach Blockade der PI3-K (0,043 +/- 0,010 RLU; n = 8) wurde die Zunahme der O₂⁻-Produktion durch SHP-1 Antisense Magnetofektion (0,108 +/- 0,011 RLU; n = 24; $p < 0,01$) im Vergleich zu Kulturbedingungen (0,041 +/- 0,004 RLU (n = 40) und *Random* Magnetofektion (0,044 +/- 0,006 RLU; n = 24) signifikant verhindert. Die Inkubation mit Wortmannin alleine zeigte keine Veränderung zur Kontrolle (0,049 +/- 0,006 RLU; n = 4).

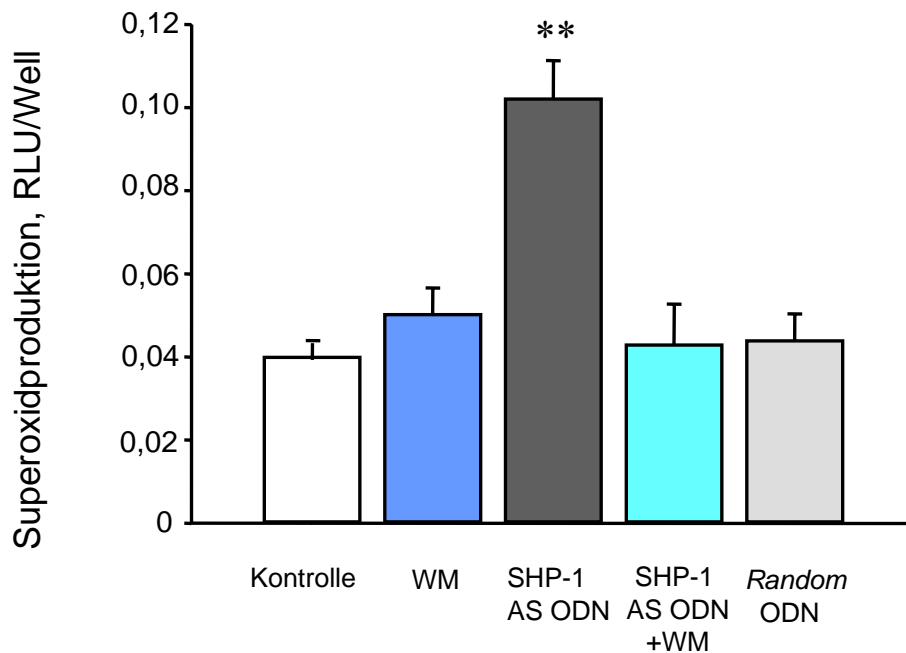


Abbildung 11: Hemmung der SHP-1 steigerte die O_2^- -Produktion via PI3 Kinase

Messung der O_2^- -Freisetzung in HUVEC mit der Cytochrom C Methode nach Hemmung der SHP-1 durch SHP-1 Antisense Magnetofektion und Hemmung der PI3-K mit Wortmannin (WM). Die Inhibition der PI3-K verhinderte die Zunahme der Sauerstoffradikalfreisetzung durch SHP-1 Antisense Oligonukleotid Magnetofektion. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$.

D.5.2. Rolle der SHP-1 bei Phosphorylierung und Dephosphorylierung der p85 Untereinheit der PI3-Kinase in HUVEC

Im folgenden Westernblot wurde zunächst gegen p85 immunopräzipitiert und anschließend mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper das Ausmaß der p85 Tyrosinphosphorylierung gemessen. Es konnte beobachtet werden, dass nach Ausschaltung der SHP-1 durch Antisense Magnetofektion signifikant mehr phosphoryliertes p85 ($188 \pm 49 \%$; $p < 0,05$) im Vergleich zur *Random* Magnetofektion (= Kontrolle = 100 %) vorliegt (gezeigt in 6 voneinander unabhängigen Experimenten, Densitometrie).

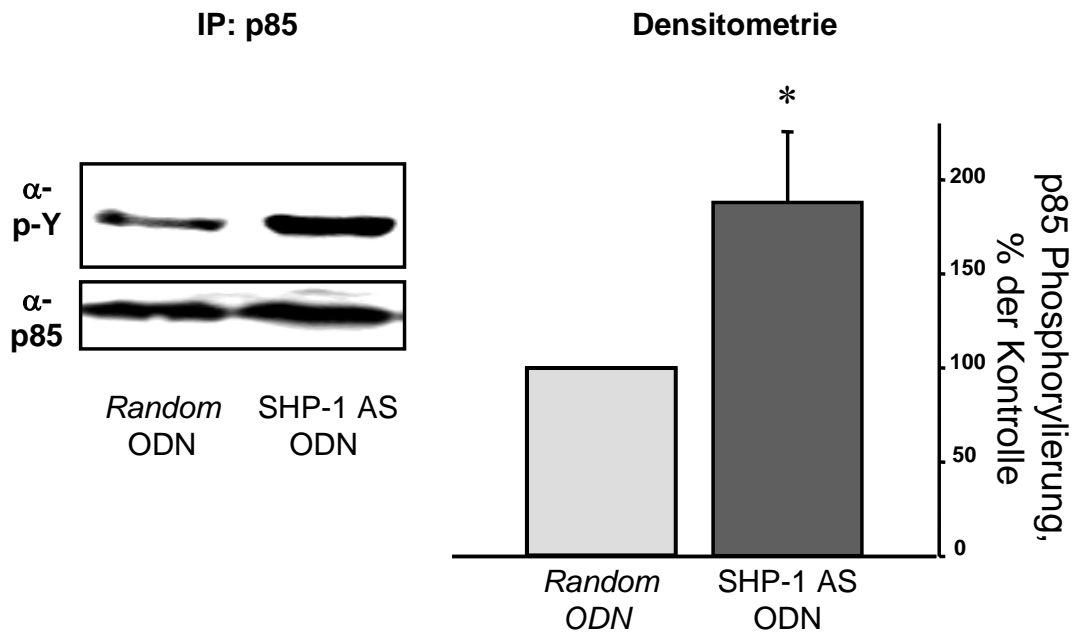


Abbildung 12: SHP-1 dephosphoryliert die regulatorische p 85 Untereinheit der PI3-Kinase

Westernblot von HUVEC Lysaten, präzipitiertes p85 und geblottet gegen phosphoryliertes Tyrosin. Nach dem Knockout der SHP-1 durch SHP-1 Antisense Oligonukleotid Magnetofektion konnte eine vermehrte Tyrosinphosphorylierung der regulatorischen p 85 Untereinheit der PI3-K festgestellt werden. *: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,05$.

D.5.3. *Rac1-Aktivität nach Hemmung der SHP-1 in HMEC*

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus, welcher der Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch die PI3-K zu Grunde liegt, wurde ein Rac1-Pull-Down-Assay aus konfluenten HMEC Monolayern (10cm Schalen) durchgeführt. Nach SHP-1 Antisense Magnetofektion genauso wie nach SG-Behandlung wurde im Vergleich zum *Random* transfizierten Ansatz vermehrt GTP beladenes (und damit aktives) Rac1 (s. C.6.) beobachtet. Bei zusätzlicher Hemmung der PI3-K mit Wortmannin konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden (3 voneinander unabhängige Experimente). Die Quantifizierung mittels Densitometrie zeigte die Signifikanz der Ergebnisse.

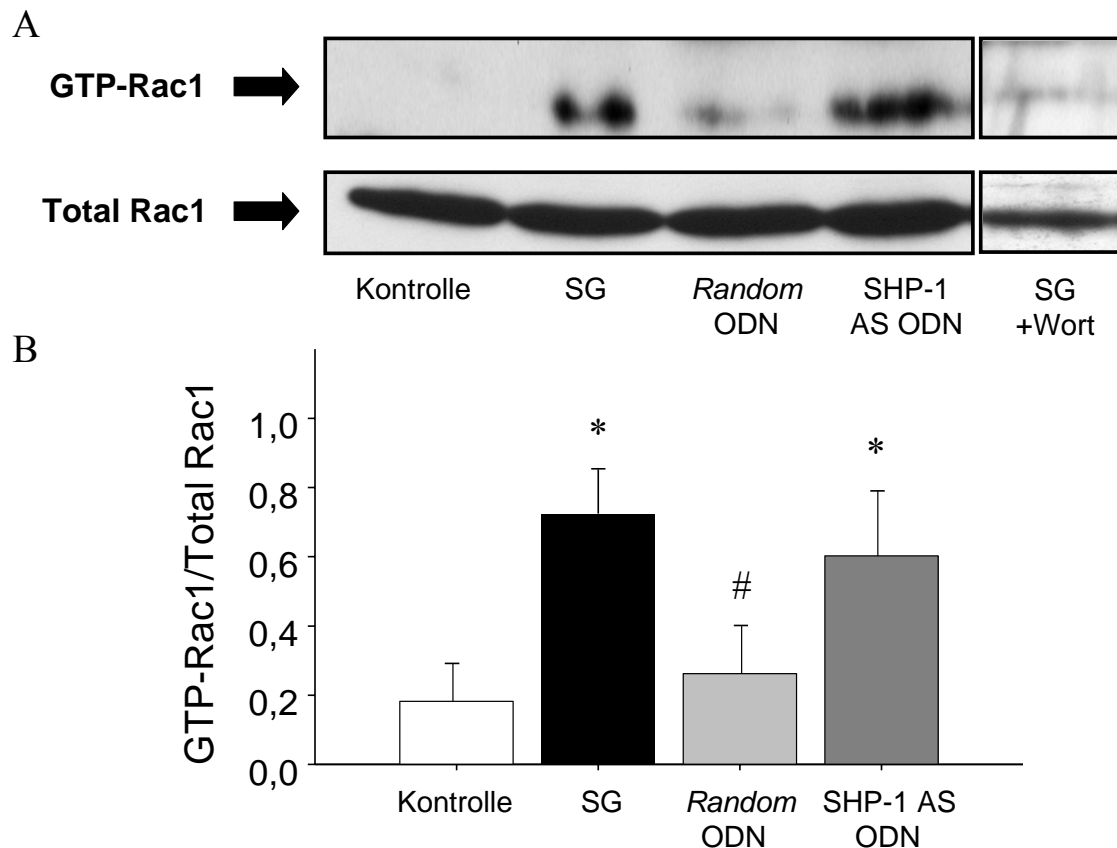


Abbildung 13 A: Pull-Down-Assay: Rac 1 wurde durch Inhibition der SHP-1 vermehrt aktiviert. Abbildung 13 B: Densitometrie des Pull-Down Assays

Pull-Down-Assay von Rac 1 in HMEC Lysaten. Es konnte ein vermehrtes Vorhandensein von aktivem Rac1 (an GST-PAK gebundenes Rac 1 (= GTP-beladen)) nach Hemmung der SHP-1 mit SG und SHP-1 Magnetofektion beobachtet werden. SG induzierte Rac 1 Aktivierung konnte durch Inhibition der PI3-K mit Wortmannin (WM) verhindert werden. *: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,05$; #: signifikant unterschiedlich vs. SG: $p < 0,05$.

D.5.4. Lokalisierung von Rac1 und gp91^{phox} nach Hemmung der SHP-1 und der PI3-Kinase in HMEC

Im Folgenden wurde eine Immunfluoreszenz-Kofärbung von Rac 1 und gp91^{phox} in HMEC Monolayern mit und ohne Inhibition der SHP-1 und der PI3-K durchgeführt. Nach Blockade der SHP-1 mit SG konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine vermehrte Translokation von Rac1 zu gp91^{phox} vorwiegend im Zytosol von HUVEC gesehen werden, welche nach der zusätzlichen Blockade der PI3-K ausblieb (6 verschiedene voneinander unabhängige Experimente).

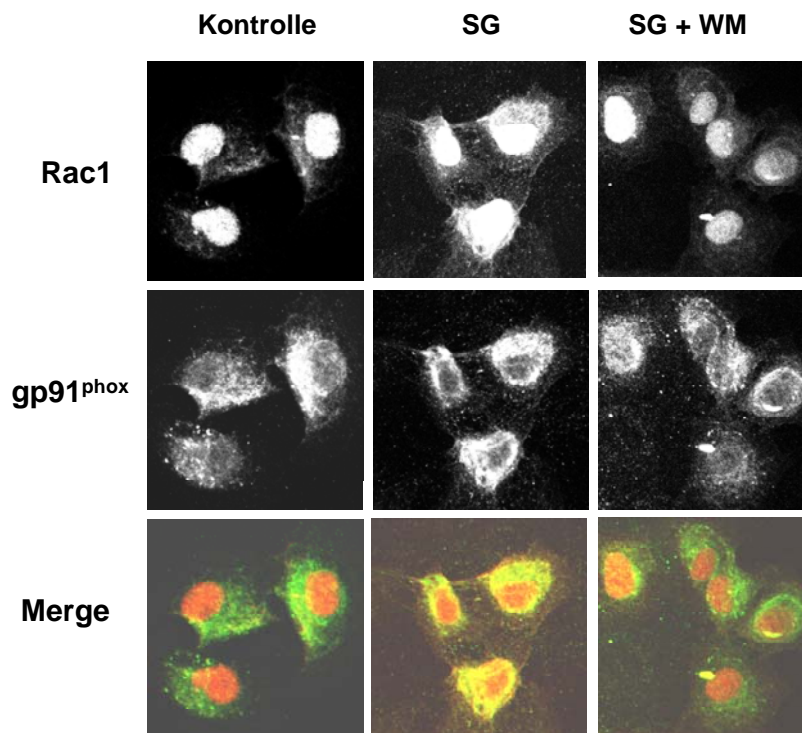


Abbildung 14: Rac 1 Redistribution zu gp 91^{phox} nach Hemmung der SHP-1, Ausbleiben nach zusätzlicher Hemmung der PI3-Kinase

Konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenz gefärbten Rac 1 und gp 91^{phox} in HMEC. Rac 1 und gp 91^{phox} kolokalisierten besonders nach Hemmung der SHP-1 mit SG (Gelbfärbung Merge). Dieser Effekt blieb nach Hemmung der PI3-K mit Wortmannin aus (Rac 1 und gp91^{phox} verhalten sich wie in der Kontrollgruppe).

D.6. „PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER SHP-1“ – VEGF UND 17 β -ESTRADIOL STEuern DIE ENDOTHELIALE O₂⁻ - BILDUNG DURCH REGULIERUNG DER SHP-1

Es ist bekannt, dass die NAD(P)H-Oxidase vermittelte Bildung von Superoxidradikalen im Endothel durch 17 β -Estradiol gehemmt wird, ein Vorgang in den Rac1 involviert ist, dessen Mechanismus aber ungeklärt ist. Wir untersuchten in HUVEC, ob die SHP-1 die VEGF-induzierte Superoxidradikalbildung hemmt und ob sie auch an der Estradiol-vermittelten Abschwächung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase beteiligt ist.

D.6.1. Steigerung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch VEGF in HUVEC

Zunächst wurde untersucht, ob VEGF zu einer Steigerung der NAD(P)H-Oxidase Aktivität führt. Dazu wurde die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität direkt gemessen. VEGF (10 ng/ml; 30 Minuten Präinkubation; in folgenden Versuchen genauso verwendet) steigerte die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase auf mehr als das Doppelte ($2,51 \pm 0,36 \text{ nmol O}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; $n = 12$; $p < 0,01$ vs. Kontrolle) der Kontrollgruppenaktivität ($0,98 \pm 0,28 \text{ nmol O}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; $n = 9$). Eine Ausschaltung der NAD(P)H-Oxidase durch das spezifische Hemmpeptid *gp91ds-tat* (100 μM) konnte die Aktivitätssteigerung durch VEGF verhindern ($0,55 \pm 0,16 \text{ nmol O}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; $n = 12$; $p < 0,05$ vs. VEGF + *scrambled-tat*), nicht jedoch das *scrambled* Peptid ($1,32 \pm 0,57 \text{ nmol O}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; $n = 9$; $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

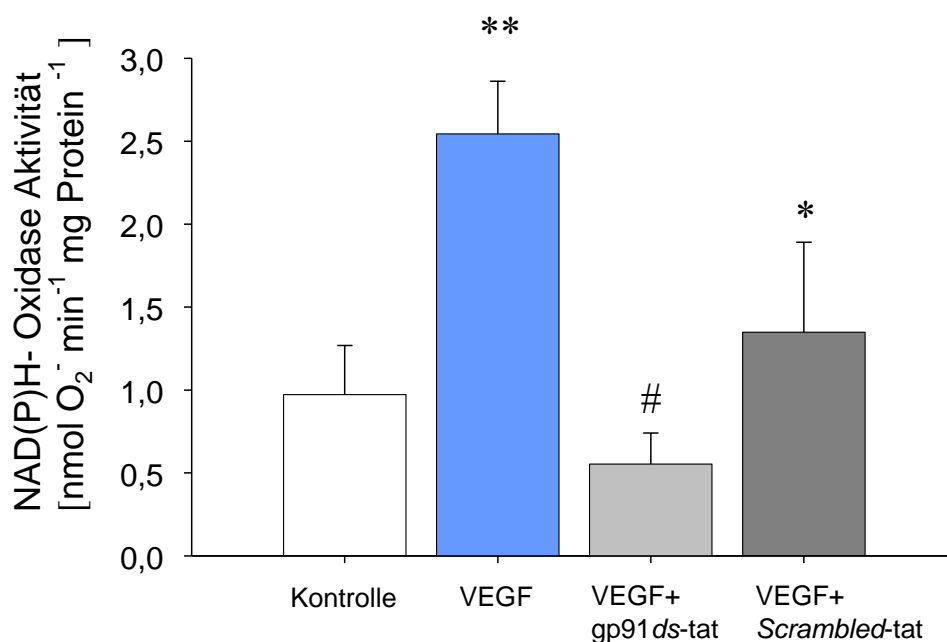


Abbildung 15: VEGF stimuliert die NAD(P)H-Oxidase Aktivität

VEGF verdoppelt die endotheliale NAD(P)H-Oxidase Aktivität, was durch das spezifische NAD(P)H-Oxidase Hemmpeptid *gp91ds-tat*, nicht aber durch ein *scrambled* Peptid verhindert wird. Messung der NADH-abhängigen Cytochrom C (Cyt-C) Reduktion in Lysaten von HUVEC. */*: signifikant unterschiedlich vs Kontrolle: $p < 0,05$ bzw. $0,01$; #: signifikant unterschiedlich vs. VEGF: $p < 0,05$.

D.6.2. Auswirkung von Estradiol auf die VEGF-bedingte Steigerung der Radikalformation in HUVEC

Auch in Radikalmessungen mit der Cytochrom C Methode in konfluenten HUVEC (24 Well Platten) fanden wir nach Stimulation mit VEGF eine hoch signifikant gesteigerte Produktion von O_2^- (0,035 \pm 0,003 RLU; $p < 0,01$ vs. Kontrolle) im Vergleich zu Kulturbedingungen (0,021 \pm 0,004 RLU). In weiteren Radikalmessungen wurde auch beobachtet, dass durch Estradiol (100 nM) die VEGF bedingte Stimulation der Sauerstoffradikal-Produktion verhindert werden kann (0,023 \pm 0,002 RLU; $p < 0,01$ vs. VEGF). Durch eine alleinige Inkubation mit Estradiol konnte aber keine signifikante Veränderung der Radikalproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden (0,024 \pm 0,003 RLU; in allen Ansätzen $n = 18$).

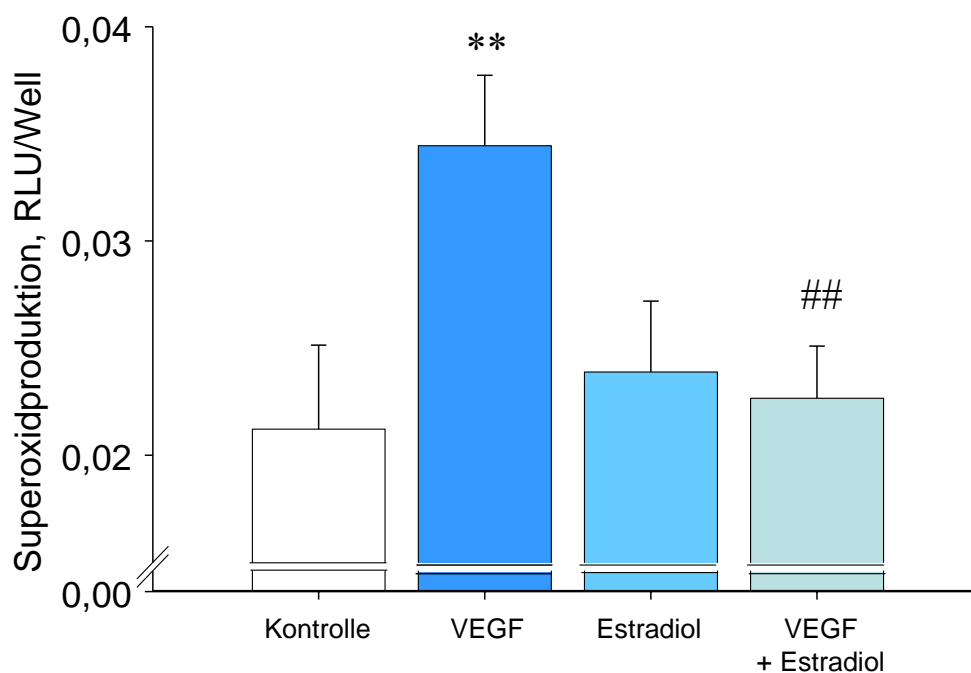


Abbildung 16: 17 β -Estradiol verhindert die VEGF-abhängige O_2^- -Bildung.

VEGF steigert die O_2^- -Produktion in Endothelzellen. Estradiol verhindert diesen Effekt. Cytochrom C Messung in HUVEC. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$; ##: signifikant vs. VEGF: $p < 0,01$.

D.6.3. Rolle der SHP-1

In weiterführenden Versuchen sollte nun gezeigt werden, ob die Estradiol-bedingte Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion durch eine Aktivierung der SHP-1 verursacht sein könnte. Zur Hemmung der SHP-1 wurden wiederum zwei verschiedene Methoden angewandt: zum einen die pharmakologische Inhibition mit SG und zum anderen die Ausschaltung der SHP-1 durch SHP-1 Antisense Magnetofektion.

SG bzw. VEGF steigerten jeweils die Sauerstoffradikalproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Durch eine gemeinsame Inkubation von SG und VEGF ließ sich die Sauerstoffradikalproduktion im Vergleich zu VEGF alleine (0,069 +/- 0,003 RLU; $p < 0,01$ vs. Kontrolle) noch weiter signifikant steigern (0,077 +/- 0,004 RLU; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $p < 0,05$ vs. VEGF; $n = 6$ in allen Versuchsansätzen).

Eine Inhibition der SHP-1 mit SG konnte den radikalsenkenden Effekt des Estradiols (100 nM) nach Stimulation mit VEGF (0,041 +/- 0,005 RLU; $p < 0,01$ vs. VEGF) verhindern (0,085 +/- 0,011 RLU; $p < 0,01$ vs. Kontrolle).

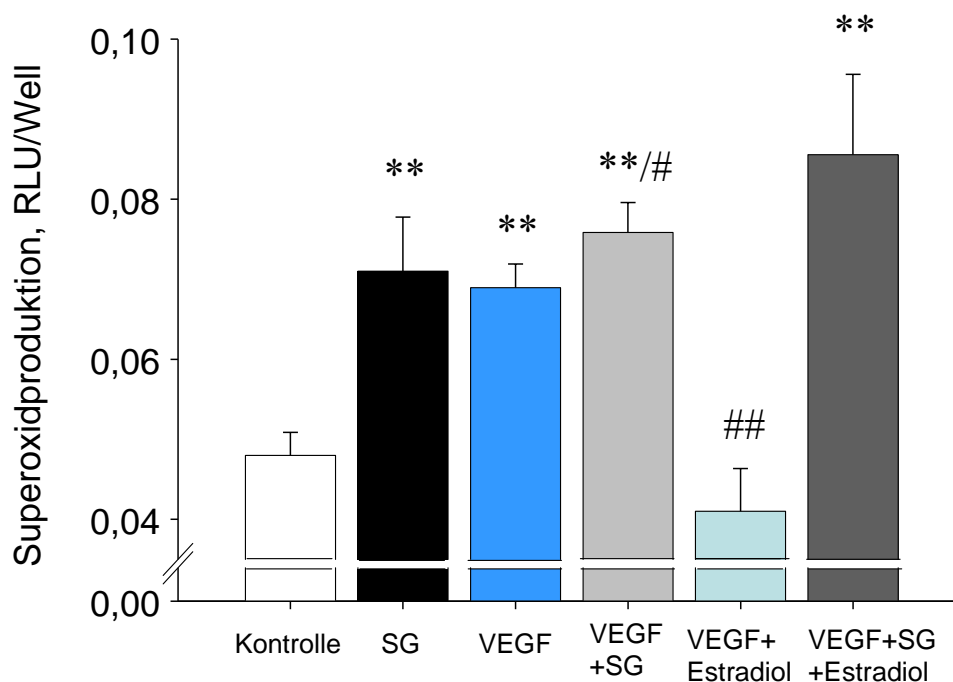


Abbildung 17: Inhibition der SHP-1 mit SG verhindert den Effekt von 17 β -Estradiol auf die VEGF-bedingte Steigerung der O₂⁻-Bildung.

Hemmung der endothelialen SHP-1 mit SG erhöht die VEGF-induzierte und basale Sauerstoffradikalbildung in HUVEC. Nach Hemmung der SHP-1 kann 17 β -Estradiol die VEGF-abhängige Sauerstoffradikalbildung in HUVEC nicht mehr verhindern (Cyt-C-Messung). VEGF und SG erreichen eine signifikant höhere Radikalformation als VEGF alleine. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,01$; ##/###: signifikant unterschiedlich vs. VEGF: $p < 0,05$ bzw. $0,01$.

Die Ausschaltung der SHP-1 durch Antisense Magnetofektion zeigte den gleichen Effekt wie die pharmakologische Inhibition der SHP-1 mit SG. Kulturbedingungen und Inkubation von VEGF gemeinsam mit Estradiol (100 nM) lieferten signifikant niedrigere Werte ($0,048 \pm 0,002$ RLU; $n = 36$ bzw. $0,041 \pm 0,005$ RLU; $n = 6$; $p < 0,01$ vs. VEGF) im Vergleich zur Inkubation mit VEGF alleine ($0,068 \pm 0,003$ RLU; $n = 6$; $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Auch SHP-1 Antisense Magnetofektion konnte die Radikalsenkende Wirkung von Estradiol nach VEGF Inkubation ähnlich wie SG verhindern ($0,088 \pm 0,005$ RLU; $n = 6$; $p < 0,01$ vs. Kontrolle).

Ähnlich wie VEGF und SG verursachte die Inkubation von VEGF mit SHP-1 Antisense Magnetofektion eine Zunahme der Radikalformation ($0,086 \pm 0,005$ RLU; $n = 6$; $p < 0,01$ vs. Kontrolle).

0,05 vs. VEGF) im Vergleich zu VEGF alleine (0,068 +/- 0,003 RLU; n = 6; p < 0,01 vs. Kontrolle).

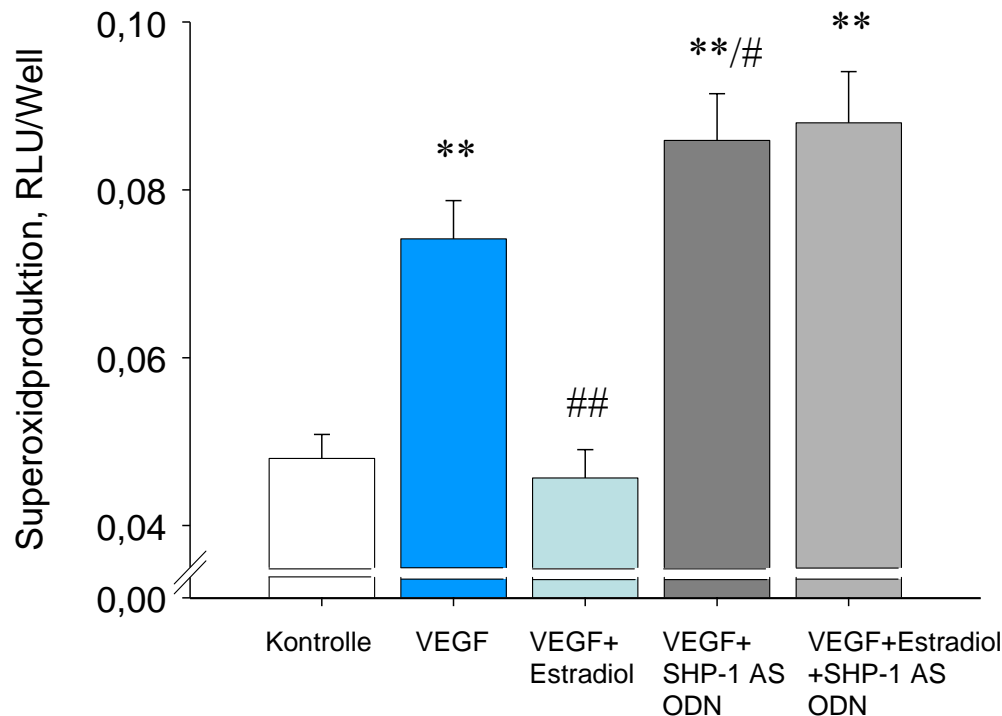


Abbildung 18: Inhibition der SHP-1 mit SHP-1 AS verhindert den Effekt von 17 β -Estradiol auf die VEGF-bedingte Steigerung der O₂⁻-Bildung.

Ausschaltung der endothelialen SHP-1 durch Antisense Magnetofektion erhöhte ebenfalls die VEGF-induzierte Sauerstoffradikalbildung in HUVEC und verhinderte den antioxidativen Effekt von Estradiol (Cyt-C-Messung). Inhibition der SHP-1 zusammen mit der Inkubation von VEGF erreichte die höchsten Werte bei der Sauerstoffradikalproduktion. **: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: p < 0,01; ###: signifikant unterschiedlich vs. VEGF: p < 0,05 bzw. 0,01.

D.6.4. SHP-1 Aktivität in Anwesenheit von Estradiol und VEGF in HUVEC

Anschließend wurde die Aktivität der SHP-1 mittels des Phosphatase Assays in HUVEC Lysaten gemessen. Es konnte eine signifikant erhöhte Aktivität der SHP-1 nach 17 β -Estradiol Inkubation (100 nM; 0,243 +/- 0,015 RLU/mg Protein; p < 0,05 vs. Kontrolle) im Vergleich zu Kulturbedingungen (0,162 +/- 0,01 RLU/mg Protein) beobachtet werden. Ebenso steigerte VEGF die Aktivität der SHP-1 (0,217 +/- 0,009 RLU/mg Protein; p < 0,05 vs. Kontrolle). Nach gemeinsamer Inkubation mit VEGF und Estradiol konnte die

größte Steigerung der SHP-1-Aktivität erreicht werden ($0,282 \pm 0,026$ RLU/mg Protein; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $p < 0,05$ vs. VEGF). Im Vergleich zu Estradiol alleine war die Zunahme der gemeinsamen Inkubation von VEGF und Estradiol nicht signifikant ($n = 5 - 13$ in allen Versuchsansätzen).

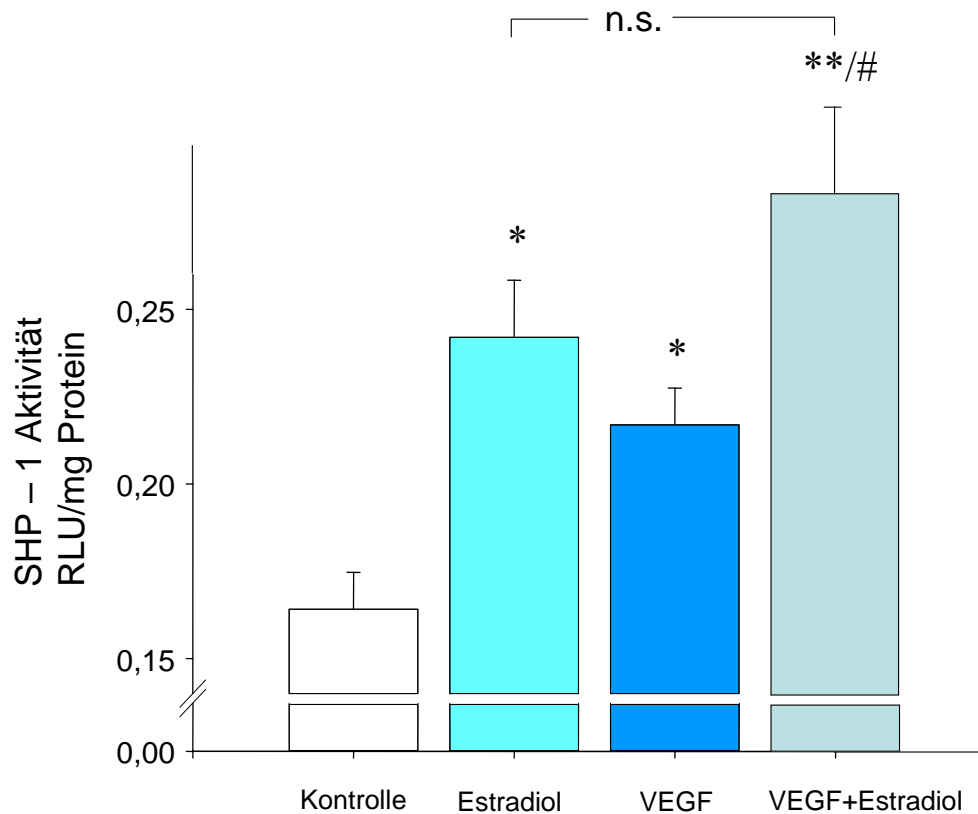


Abbildung 19: Steigerung der SHP-1 Aktivität durch VEGF und Estradiol

Sowohl VEGF als auch Estradiol aktivieren die SHP-1 in HUVEC (pNPP-Umsatz nach Immunopräzipitation von SHP-1). VEGF und Estradiol gemeinsam aktivieren die SHP-1 signifikant stärker als VEGF allein. Im Vergleich zu Estradiol wird keine signifikante Steigerung der Radikalproduktion erreicht. */*: signifikant unterschiedlich vs. Kontrolle: $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$; #: signifikant vs. VEGF: $p < 0,05$.

E. Diskussion

SHP-1 ist in ruhenden Endothelzellen aktiv

Das Ziel unserer Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welche Rolle die SHP-1 bei der Regulation der NAD(P)H-Oxidase-abhängigen endothelialen Sauerstoffradikalbildung spielt. Wie bereits in vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, konnten wir den Nachweis der SHP-1-Expression in Endothelzellen auf Proteinebene führen (Abb. 3). Wir konnten zeigen, dass die SHP-1 in HUVEC unter den Bedingungen unserer Zellkultur (Kontrolle) bereits eine basale Aktivität besitzt (Abb. 4).

Inhibition der SHP-1

Eine Inhibition der SHP-1 wurde durch zwei verschiedene Vorgehensweisen erreicht: Mittels pharmakologischer Inhibition und durch Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden. In frühen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte die Oligonukleotid-Antisense-Transfektionsmethode durch die Technik der Magnetofektion bereits deutlich verbessert werden: Die Effizienz dieser Methode mit ca. 90 % Transfektionsrate liegt deutlich über der Standardmethode (ca. 30 % Effizienz). Zusätzlich wird durch die starke Verkürzung der Inkubationszeit die Zytotoxizität signifikant reduziert (Krötz *et al.*, 2003, *Mol. Ther.*; Krötz *et al.*, 2003, *J. Vasc. Res.*; Plank *et al.*, 2003, *Expert. Opin. Biol. Ther.*; Plank *et al.*, 2003, *Biol. Chem.*). Dies ist für den weiteren Versuchsablauf besonders wertvoll, da dank dieser Methode der Zellverlust durch zytotoxischen Zelltod minimiert werden kann. Der Versuchsaufbau und die Vorteile der Magnetofektion im Vergleich zur Standardtransfektionsmethode wurde bereits im Material-und-Methoden-Teil ausführlich beschrieben.

Nach SHP-1 Antisense Magnetofektion konnte in der Tat in weiterhin vitalen HUVEC-Monolayern die Aktivität der SHP-1 im Vergleich zur *Nonsense*-Transfektion sehr effektiv reduziert werden.

Alternativ wurde die Aktivität der SHP-1 mit einem pharmakologischen Inhibitor reduziert. Pathak *et Yi* beschrieben 2001 Natrium Stibogluconat (SG) als potenten Hemmstoff der SHP-1 in hämatopoetischen Zellen, ein Medikament, das gegen Leishmaniose eingesetzt wird (Mahmoud *et Warren* 1977). SG bindet an die katalytische

Untereinheit der SHP-1 und bildet einen stabilen Komplex. *Pathak et Yi* beschrieben 10 µg / ml als diejenige Konzentration, bei der die Aktivität der SHP-1 in hämatopoetischen Zellen maximal reduziert wird. Wir konnten in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen auch in HUVEC eine signifikante pharmakologische Reduktion der SHP-1-Aktivität im *Phosphatase-Assay* (Abb. 4) bei dieser Dosierung erzielen.

Bedeutung der SHP-1-Hemmung für die O₂⁻-Bildung

Die fundamentale Bedeutung der SHP-1 im Organismus zeigten die Befunde an SHP-1 defizienten Mäusen („*motheaten mice*“) (*Kruger et al.*, 2000): Der Verlust der SHP-1 Funktion resultierte in einer schwerwiegenden immunologischen Dysfunktion. Die Identifizierung der SHP-1 Mutation als für den Phänotyp der sogenannten „*motheaten mice*“ verantwortlichen Defekt, resultierte in einer intensiven Erforschung der Funktionen dieser Phosphatase. Diese Studien haben erkennen lassen, dass die SHP-1 an der Herabregulation eines weiten Spektrums von wachstumsfördernden und rezeptorvermittelten Signalkaskaden beteiligt ist. Diese schließen Signalwege ein, die beispielsweise durch Rezeptor-PTKs wie c-kit (*Yi et Ihle*, 1993; *Paulson et al.*, 1996) und den CSF-1 Rezeptor (*Chen et al.*, 1996), Cytokin Rezeptoren wie IL-3 (*Yi et Ihle*, 1993) und IFN-γ (*David et al.*, 1995) und Immunorezeptoren, die das Immuno-Rezeptor, Tyrosin-basierende, inhibitorische Motiv („*ITIM*“) wie CD 22 (*Law et al.*, 1996) und PIR-B („*paired Ig-like receptor B*“) (*Berg et al.*, 1998; *Maeda et al.*, 1999) enthalten, ausgelöst werden. SHP-1 moduliert diese Signalkaskaden über eine Fülle von unterschiedlichen molekularen Interaktionen, einschließlich der Dephosphorylierung von Rezeptor Tyrosin Kinasen (*Yi et Ihle*, 1993, *Chen et al.*, 1996; *Tomic et al.*, 1995), der Interaktion mit nicht-katalytischen Untereinheiten von Rezeptoren (z.B. Zytokinrezeptoren), der Dephosphorylierung von assoziierten Tyrosin Kinasen der Janus Familie (*David et al.*, 1995; *Klingmuller et al.*, 1995) oder *via* Interaktionen mit zytosolischen Signaleffektoren wie Vav, Slp-76 (*Mizuno et al.*, 1996) und Lck (*Law et al.*, 1996; *Binstadt et al.*, 1996; *Lorenz et al.*, 1996; *Plas et al.*, 1996; *Pani et al.*, 1995; *Kon-Kozlowski et al.*, 1996). Interessanterweise dephosphoryliert die SHP-1 auch die PI3-K (*Cuevas et al.*, 2001), die, wie bereits erwähnt, Teil eines aktivierenden Signalwegs der NAD(P)H-Oxidase ist.

In Messungen der O_2^- -Produktion mit der Cytochrom C Meßmethode zeigte sich nach SG-Inkubation (10 ng / ml) eine signifikante Zunahme der Sauerstoffradikalbildung, was mit einer hemmenden Rolle von SHP-1 bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase vereinbar ist. Diese Steigerung durch SG ist dosisabhängig.

In einer Dosisreihe (Abb. 5) an HUVEC (SG Konzentration von 10 bis 100 ng / ml) waren die höchsten Werte an O_2^- -Produktion (Cytochrom C Meßmethode) bei einer Konzentration von 10 ng / ml zu beobachten. Bei höheren SG-Konzentrationen war keine Steigerung der ROS-Formation mehr zu beobachten. Dies könnte auf unspezifische Wirkung von SG in höheren Konzentrationen zurück zu führen sein: So hemmt SG in höheren Konzentrationen nicht mehr spezifisch die SHP-1, sondern unter anderem auch vollständig die SHP-2 und die PTP1B (Pathak *et* Yi, 2001).

Die Steigerung der O_2^- -Produktion war zeitabhängig. Ab 30 Minuten Inkubation mit SG 10 ng / ml war die O_2^- -Produktion nicht mehr signifikant zu steigern (Abb. 6). Wir folgerten daraus, dass eine maximale Hemmaktivität nach 30 Minuten mit einer Konzentration von 10 ng / ml erreicht ist.

Zur Bestätigung dieser mit dem pharmakologischen Hemmstoff SG gewonnenen Ergebnisse, wurde die O_2^- -Formation auch nach SHP-1 Antisense-Magnetofektion und nach siRNA-Magnetofektion (posttranskriptioneller *Silencing* Mechanismus) bestimmt: Die O_2^- -Formation konnte ähnlich wie nach SG-Behandlung auch durch SHP-1 Antisense Magnetofektion und durch Magnetofektion mit siRNA signifikant gesteigert werden (Abb. 7). Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Reduktion der Aktivität von SHP-1 unabhängig von der verwendeten Methode immer zu einer Steigerung der O_2^- -Produktion führt.

Quelle der O_2^- -Bildung

Um zu untersuchen, welcher der potentiellen ROS-bildenden Prozesse in der Zelle durch SHP-1 beeinflusst wird, führten wir nach pharmakologischer Inhibition der SHP-1 Messungen der O_2^- -Produktion (Cytochrom C-Meßmethode) nach Vorbehandlung mit Hemmern von verschiedenen potentiell radikalbildenden Enzymen durch (Abb. 8). Die Inhibition von Xanthinoxidase, Cyclooxygenase und CYP2C9 hatte keinen Einfluss auf die Steigerung der O_2^- -Bildung durch SHP-1 Hemmung. Eine Inhibition der NAD(P)H-Oxidase mit dem spezifischen Hemmpeptid *gp91ds-tat* reduzierte dagegen die erhöhte O_2^- -Formation nach SG-Stimulation auf Kontrollgruppenniveau (Abb. 9).

Darüber hinaus konnten wir mittels eines NAD(P)H-Oxidase-Aktivitäts-*Assays* direkt zeigen, dass die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase durch SHP-1 Antisense-Magnetofektion hoch signifikant gesteigert wurde (Abb. 10).

Sowohl der Nachweis einer Aktivität der SHP-1 in unstimulierten Zellen, als auch die Steigerung der O_2^- -Produktion nach Inhibition der SHP-1 deuten darauf hin, dass die SHP-1 in ruhenden Endothelzellen konstitutiv aktiv ist. In der Literatur ist beschrieben, dass auch die NAD(P)H-Oxidase in vaskulären Zellen im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten eine basale Aktivität besitzt (Babior, 1999; Griending, 2000). Unsere Ergebnisse zeigen, dass in ruhenden Endothelzellen das Ausmaß der Sauerstoffradikalformation, produziert durch die NAD(P)H-Oxidase, durch die Aktivität der SHP-1 reguliert wird.

Mechanismus der NAD(P)H-Oxidase-Hemmung durch SHP-1

Der Mechanismus durch den die SHP-1 eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase bewirkt ist damit noch nicht geklärt. Für die SHP-1 sind einige Interaktionspartner bekannt, so assoziiert sie beispielsweise in haematopoetischen Zellen mit Vav, Grb2 oder mSos1 (Kon-Kozlowski *et al.*, 1996).

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die SHP-1 an die p85 Untereinheit der PI3-K bindet und dabei dephosphoryliert. Diese Interaktion ist assoziiert mit einer Reduktion der PI3-K Aktivität (Cuevas *et al.*, 1999). Unter Ruhebedingungen scheint p85 die p110 Untereinheit sowohl zu stabilisieren, als auch die PI3-K Aktivität zu inhibieren (Yu *et al.*, 1998). Eine Tyrosinphosphorylierung von p85 resultiert dagegen in einer Reduktion der

p85 vermittelten Inhibition der PI3-K und führt zur Kolokalisierung der PI3-K (Yu *et al.*, 1998; Rameh *et al.*, 1999; Blalock *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1998; Cuevas *et al.*, 2001). Beispielsweise phosphoryliert die katalytische p110 Untereinheit die 3'-Hydroxylgruppe des Inositolrings von Phosphatidylinositol (Carpenter *et al.*, 1996; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Dabei entsteht aus Phosphatidylinositol (4, 5)-Diphosphat (PIP₂) der *Second Messenger* Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-Triphosphat (PIP₃). PIP₃ vermittelt die Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen, GEFs („*guanosin exchange factor*“), die wiederum Rac aktivieren (Welch *et al.*, 2003). Insgesamt kann so eine Fülle von wichtigen Zellfunktionen wie beispielsweise Transkription, Translation, Proteinsynthese, Eintritt in den Zellzyklus, Zell / Zell Kontakte, Adhäsion, Struktur des Aktinzytoskeletts etc. (Bishop *et al.*, 2000; Etienne-Manneville *et al.*, 2002) beeinflusst werden.

Da die Inhibition der PI3-K mit Wortmannin einen Anstieg der Sauerstoffradikalproduktion (Cytochrom C-Meßmethode an HUVEC Monolayern) nach Ausschaltung der SHP-1 mit Antisense Magnetofektion verhinderte (Abb. 11), könnte die PI3-K tatsächlich ein Bestandteil der SHP-1 induzierten Signalkette sein. Im Westernblot (Immunopräzipitation gegen p 85, Färbung des phosphorylierten Tyrosins) liess sich in der Tat zeigen, dass nach Inhibition der SHP-1 die p 85 Untereinheit der PI3-K eine signifikant erhöhte Tyrosinphosphorylierung aufweist (Abb. 12).

Unsere Daten zeigen also vereinbar mit den Ergebnissen an hämatopoetischen Zellen, dass in ruhenden Endothelzellen die PI3-K durch konstitutive Aktivität der SHP-1 dephosphoryliert und damit inaktiviert wird. Als Folge wird dadurch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und damit die basale Sauerstoffradikalproduktion der Zelle eingeschränkt. Bei Inhibition der SHP-1 steigt der Phosphorylierungsgrad der PI3-K an (eine Phosphorylierung erfolgt durch verschiedene Tyrosinkinasen, wie beispielsweise die Lck (Cuevas *et al.*, 1999)), was auf die bereits beschriebene Weise die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und damit die O₂⁻-Produktion steigert. Dies ist mit der Aktivierung der PI3-K gleichzusetzen (Cuevas *et al.*, 2001). Eine Beteiligung der PI3-K bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase wurde auch in glatten Muskelzellen beobachtet, wo die Sauerstoffradikal-Freisetzung durch Wortmannin ebenfalls inhibiert werden konnte (Seshiah *et al.*, 2002; Marumo *et al.*, 1997).

Die PI3-K reguliert über seine *Second Messenger* (Phosphatidylinositolphosphate, PIP₂, PIP₃) unter anderem *Guanosin-Exchange*-Faktoren (GEF). GEFs sind durch Austausch des GDPs durch GTP u.a. für die Aktivierung von Rac verantwortlich (Welch *et al.*, 2003). Da Rac auch eine Untereinheit der vaskulären NAD(P)H-Oxidase darstellt, könnte dies einen Signalweg beschreiben, der die SHP-1 (*via* PI3-K *via* Rac) mit der NAD(P)H-Oxidase abhängigen Sauerstoffradikal-Produktion verbindet.

Prinzipiell sind zwei Wege bekannt, die zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führen können. Erstens ein tyrosinphosphorylierungs-abhängiger, der verantwortlich für die Membrantranslokation von Rac 1 ist (Sohn *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*). Zweitens ein Serin / Threonin-phosphorylierungs-abhängiger, durch den p47^{phox} an die Membran zur NAD(P)H-Oxidase transloziert (Frey *et al.*, 2002). In weiteren Untersuchungen gingen wir daher der Frage nach, welcher dieser Signalwege durch die PI3-K beeinflusst wird.

Die Rolle von Rac 1 bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir in unseren Experimenten eine signifikant erhöhte Rac 1-Aktivität (Rac 1-Pull-Down-Assay) nach Hemmung der SHP-1 mit SHP-1 Antisense Magnetofektion nachweisen (Abb. 13A+B). Die Erhöhung der Aktivität wurde durch eine zusätzliche Ausschaltung der PI3-K mit Wortmannin verhindert. Auch in konfokalen Aufnahmen Immunfluoreszenz-gefärbter HMEC (Abb. 14) konnten wir eine Redistribution von Rac 1 zu gp91^{phox} nach Hemmung der SHP-1 sehen. Durch die zusätzliche Inhibition der PI3-K mit Wortmannin blieb dieser Effekt aus. Das bedeutet, dass eine verminderte Aktivität der SHP-1 eine verstärkte Aktivierung der PI3-K bewirkt, was wiederum zur Membrantranslokation von Rac 1 und damit zu einer gesteigerten Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führt.

Alle Rho-Familien GTPasen einschließlich der Rac Proteine sind molekulare „Schalter“, die inaktiv sind, wenn Guanosindiphosphat (GDP) gebunden ist und die aktiv sind, wenn sie mit Guanosintriphosphat (GTP) geladen sind (Schmidt *et al.*, 2002). Sind Rac Proteine GTP-beladen, binden sie ihre Targetproteine, wobei für Rac zur Zeit ca. 15 Targetproteine bekannt sind (Bishop *et al.*, 2000). In ruhenden Zellen ist Rac-GDP inaktiv, zytosolisch und generell an einen „GDP dissociation inhibitor“ (GDI) gebunden. Nach Dissoziation des GDI wandert Rac zur Membran und geht mit seinem C-terminalen

Ende eine Bindung mit ihr ein. Dieser Schritt erlaubt die Bindung des aktivierenden Enzyms, dem *Guanine-Nucleotide Exchange Factor* (GEF). Der GEF setzt die Nukleotidbindungsstelle der GTPase frei, was den Austausch von GDP durch GTP bewirkt, dessen Konzentration im Vergleich zum GDP im Zytosol viel höher ist. Die Inaktivierung erfolgt durch die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP ausgelöst durch die intrinsische GTPase Aktivität von Rac (Welch *et al.*, 2003).

Eine große Zahl von Belegen zeigt eine Aktivierung von Rac *via* PIP₃ sensitiven Rac-GEFs. PIP₃ kann *in vitro* Rac sogar direkt binden und bei höheren Konzentrationen von PIP₃ die Dissoziation von GDP weg von Rac erleichtern (Missy *et al.*, 1998).

Nach aktuellen Erkenntnissen zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Arbeit wird Rac sogar durch Tyrosinkinase-abhängige GEFs direkt aktiviert (Werner, 2004), was ebenfalls unsere Hypothese unterstützt.

Rolle der SHP-1 für die Endothelfunktion

Die Ergebnisse unserer Experimente unterstützen übereinstimmend mit der Literatur unsere Hypothese, dass die SHP-1 als molekularer Schalter eine wichtige Rolle bei der Regulierung der NAD(P)H-Oxidase Aktivität spielt. Ihre konstitutive Aktivität senkt die Radikalbildung auf ein „basales Maß“, welches für die Funktion des Endothels, z. B. die Verfügbarkeit von NO, wichtig ist. Als Vermittler ihres Signals verwendet die SHP-1 die PI3-K, welche *via* Rac1 die NAD(P)H-Oxidase kontrolliert.

Somit könnte Änderungen der SHP-1 Aktivität oder Expression in Endothelzellen eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung der Endotheldysfunktion zukommen.

Ein Verlust der SHP-1 Funktion in Endothelzellen könnte so zu einem erhöhten oxidativen Stress in der Gefäßwand führen, der ursächlich für Gefäßveränderungen bei kardiovaskulären Erkrankungen ist. Eine spezifische Beeinflussung der SHP-1 bietet für die Zukunft interessante Möglichkeiten einer pharmakologischen Prophylaxe, wenn nicht gar als Präventionsmaßnahme gegen Atherosklerose. Damit könnten eventuell bessere Erfolge erzielt werden als bei der Gabe von unspezifischen Antioxidantien (Vivekananthan *et al.*, 2003).

Die Rolle der SHP-1 bei der VEGF induzierten ROS-Produktion

VEGF ist ein wichtiger endothelspezifischer Wachstumsfaktor (Leung *et al.*, 1989; Keck *et al.*, 1989; Plouet *et al.*, 1989). VEGF stimuliert *in vitro* Mitose (Connolly *et al.*, 1989), Chemotaxis (Waltenberger *et al.*, 1994) und Thrombogenese (Clauss *et al.*, 1990) in Endothelzellen und wird durch Hypoxie hochreguliert (Shweiki *et al.*, 1992, Banai *et al.*, 1994). Darüber hinaus ist VEGF bekannt als Angiogenese-fördernder Faktor (Kroll *et Waltenberger*, 1997).

VEGF ist ausserdem als Stimulator der NAD(P)H-Oxidase bekannt. Ushio-Fukai *et al.* fanden in VSMC, dass VEGF die O_2^- -Produktion hauptsächlich über die Rac 1-abhängige, gp91^{phox} enthaltende NAD(P)H-Oxidase stimuliert (Ushio-Fukai *et al.*, 2002; Ushio-Fukai, 2006). Dieselbe Gruppe konnte in HUVEC zeigen, dass eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase eine VEGF bedingte Stimulierung der O_2^- -Produktion verhindert. Außerdem wurde von ihnen eine VEGF bedingte Membrantranslokation von Rac 1, welche für die Vollständigkeit des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes essentiell ist, sowie eine signifikante Aktivitätssteigerung der Rac-Aktivität beobachtet. In unseren Versuchen konnten wir vereinbar mit der Literatur eine signifikante Steigerung der O_2^- -Freisetzung nach Stimulation mit VEGF auch in Endothelzellen (HUVEC) mit Hilfe der Cytochrom C Meßmethode beobachten (Abb. 16). Darüber hinaus zeigten wir, dass die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase nach VEGF-Stimulation bedeutend erhöht war. Dieser Effekt ließ sich durch Ausschaltung der NAD(P)H-Oxidase durch das spezifische Hemmpeptid gp91ds-tat, nicht jedoch durch das scrambled Peptid verhindern (Abb. 15).

VEGF aktiviert jedoch nicht nur die NAD(P)H-Oxidase, sondern wirkt gleichzeitig auch steigernd auf die SHP-1-Funktion (Kroll *et Waltenberger*, 1997; Adachi *et al.*, 1996). Nach unseren Überlegungen übereinstimmend mit unseren Ergebnissen stellt dies einen autoinhibitorischen Effekt dar. Da bei Stimulierung von vaskulären Zellen mit VEGF die NAD(P)H-Oxidase zur signifikant vermehrten O_2^- -Freisetzung angeregt wird, scheint der O_2^- -Freisetzung-anregende Effekt auf die NAD(P)H-Oxidase zu überwiegen.

Auch wir konnten in unseren Versuchen eine relevante Aktivierung der SHP-1 durch VEGF beobachten. Eine gemeinsame Stimulation der SHP-1 mit VEGF und Estradiol steigerte ihre Aktivität im Vergleich zu VEGF signifikant, nicht aber zu Estradiol (Abb. 19). Passend zu diesen Ergebnissen konnte in Cytochrom C-Messungen die Ausschaltung

der SHP-1 mit SG und mit Antisense Magnetofektion die VEGF-induzierte Sauerstoffradikal-Freisetzung in HUVEC relevant steigern (Abb. 16, 17, 18). Dies bedeutet, dass bei alleiniger Stimulation der NAD(P)H-Oxidase mit VEGF die Sauerstoffradikal-Produktion trotz seines autoinhibitorischen Effektes durch gleichzeitige Aktivierung der SHP-1 erhöht werden kann: Die Wirkung auf die NAD(P)H-Oxidase überwiegt. Wird nun die SHP-1 zusätzlich inhibiert, kommt es zur alleinigen Stimulation der NAD(P)H-Oxidase, der autoinhibitorische Effekt wird aufgehoben und die Sauerstoffradikal-Freisetzung kann nochmals verstärkt werden.

Die SHP-1 stellt aufgrund unserer Befunde vereinbar mit der Literatur im kardiovaskulären System einen wichtigen antioxidativen Mechanismus dar. Es stellt sich somit die Frage, ob eine bestehende Fehlfunktion der SHP-1, angeboren oder erworben, verantwortlich sein könnte für die Entstehung oder Progression von kardiovaskulären Erkrankungen.

Spielt die SHP-1 eine Rolle bei der kardioprotektiven Wirkung von Östrogen?

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige hemmende Faktoren der NAD(P)H-Oxidase bekannt. Wagner *et al.* untersuchten 2001 den antiatherosklerotischen Effekt von Östrogen in Endothelzellen. Sie konnten zeigen, dass Östrogen die NO / O₂⁻ Balance zugunsten von NO in der Gefäßwand verschiebt. 17β-Estradiol verursachte eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der Expression von gp91^{phox}, der membrangebundenen Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, auf mRNA- und Proteinebene. Estradiol scheint durch Verbesserung des NO / O₂⁻ Verhältnisses antioxidativ zu wirken, ein Effekt, der wahrscheinlich unter anderem in Endothelzellen durch Normalisierung der Expression von proatherosklerotischen Genprodukten reguliert wird (Wagner *et al.* 2001).

Die endotheliale Dysfunktion fördert die Entstehung von Atherosklerose und ist von einer schlechten Prognose hinsichtlich kardiovaskulärer Morbidität begleitet (Schachinger *et al.*, 2000; Suwaidi *et al.*, 2000). Eine erhöhte Freisetzung von ROS und verminderte Bioverfügbarkeit von NO sind die Schlüsselereignisse in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion (Guzik *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2000; Harrison, 1997, Warnholtz *et al.*, 1999). Die genaue Kenntnis der dabei relevanten Signalwege des

Östrogens könnte daher ein Schlüssel zu neuen therapeutischen Ansätzen und Strategien zur Behandlung von Atherosklerose und Hypertension sein (Wassmann *et al.*, 2002).

Östrogen agiert durch die Verbesserung der endothelialen Funktion vasoprotektiv (Mendelsohn *et Karas*, 1999). Gesichert ist, dass Östrogen die NO-Freisetzung steigert und den oxidativen Stress durch Senkung der O_2^- -Freisetzung reduziert (Mendelsohn *et Karas*, 1999; Caulin-Glaser *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse könnten die vorteilhaften vaskulären Effekte der Östrogenersatztherapie teilweise erklären.

Eine verbesserte endotheliale Funktion kann durch eine Senkung der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion, die zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von NO führt, vermittelt werden. Wassmann *et al.* konnten mittels Lucigenin Chemolumineszenz eine deutlich reduzierte ROS -Produktion in der Gefäßwand nach Raloxifen-Gabe zeigen. Raloxifen reguliert die Expression von Rac1 in vaskulären Zellmembranen herab und vermag die Aktivität der Rac1 GTPase zu reduzieren. Darüber hinaus scheint es die membranassoziierte GTP-Bindungsaktivität von Rac zu senken (Wassmann *et al.*, 2002). Diese Befunde untermauerten eine Rolle von Östrogen als Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase.

Takeda-Matsubara *et al.* wiesen 2002 in VSMC nach, dass 17β -Estradiol die Aktivität der SHP-1 steigert (Takeda-Matsubara *et al.*, 2002).

Unsere eigenen Ergebnisse lieferten nun einen Hinweis dass Östrogen (17β -Estradiol) in Endothelzellen über die SHP-1 die O_2^- -Freisetzung senkt und auf diesem Wege einen bedeutenden Beitrag zur Erhaltung eines intakten Endothels, welches so wichtig für die Funktionsgewährleistung der Blutgefäße ist, leistet.

In unseren Versuchen konnten wir mittels der Cytochrom C-Meßmethode nach Stimulation von HUVEC mit VEGF eine signifikante Senkung der O_2^- -Freisetzung nach Estradiol-Inkubation nachweisen (Abb. 16). Wurde die SHP-1 durch Antisense Magnetofektion (Abb. 18) oder mit SG (Abb. 17) ausgeschaltet, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Auch eine direkte Messung der SHP-1 Aktivität zeigte eine deutlich vermehrte Aktivierung des Enzyms nach Estradiolbehandlung (Abb. 19). Dies erlaubt den Schluss, dass Estradiol *via* SHP-1 die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und damit auch die O_2^- -Freisetzung senkt. Diese Ergebnisse zeigen einen der Wege, wie Estradiol seine kardioprotektive Funktion ausübt und damit das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen

bei prämenopausalen Frauen relevant senkt. Gerade den erwähnten SERMs wie Raloxifen kommt daher auch die besondere Bedeutung zu, der Diskussion um die Östrogensersatztherapie eine neue Richtung zu geben, indem selektiv besonders kardiovaskuläre Östrogenrezeptoren stimuliert werden können.

Der Signalweg, über den Estradiol nach unseren Ergebnissen seine Hemmung entfaltet ist zusammenfassend in folgendem Bild veranschaulicht:

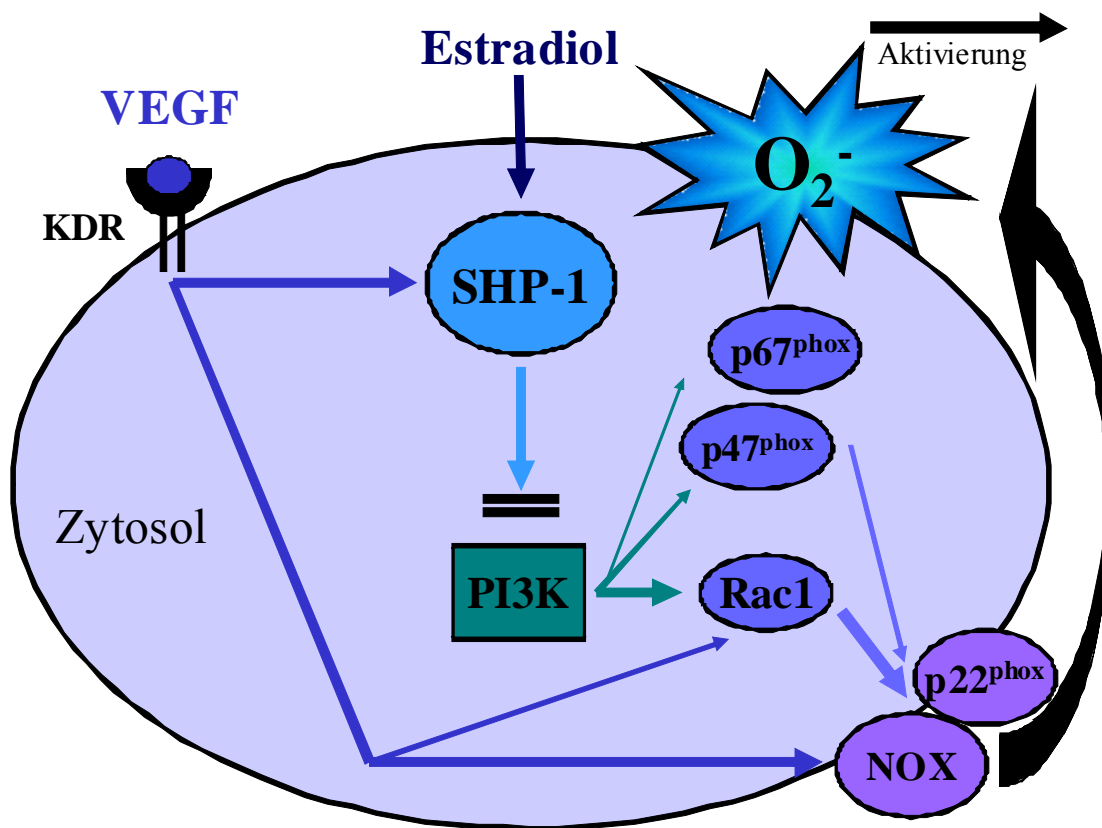


Abbildung 20: SHP – 1 in Endothelzellen

Im Zentrum steht die SHP-1, die durch Estradiol und autoinhibitorisch durch VEGF über den KDR aktiviert wird. Die SHP-1 hemmt in ruhenden Zellen die PI3-K. Eine aktive PI3-K verursacht eine Membrantranslokation von Rac1, was zur Stimulation der NAD(P)H-Oxidase führt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die PI3-K *via* p47^{phox} die Sauerstoffradikal-Freisetzung steigert. Eine direkte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase findet durch VEGF über den KDR statt.

Ausblick

Die Tatsache, dass der protektive Einfluss von Östrogen zumindest teilweise über SHP-1 Aktivierung vermittelt wird, legt im Umkehrschluss auch die Vermutung nahe, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren die SHP-1 Aktivität hemmend beeinflussen könnten.

Dies sind Fragen, die zu klären nicht nur von hohem wissenschaftlichen Interesse sind, sondern denen besonders im klinischen Alltag eine herausragende Rolle zukommt.

In unserer Arbeit konnten wir einige wichtige grundlegende Zusammenhänge darlegen, die in der näheren Zukunft vielleicht sogar Wegbereiter für die Entwicklung von Prävention, Prophylaxe und therapeutischen Strategien bzw. Richtlinien für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen.

F. Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Interaktionen mit NO und vaskulären Signalmechanismen spielen eine fundamentale Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und damit von pathophysiologischen Veränderungen innerhalb der Blutgefäße. Als Hauptquelle für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in Endothelzellen konnte die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden. Über welche Signalwege die NAD(P)H-Oxidase reguliert wird war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit weitgehend unklar.

Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Sohn *et al.*, 2000, *Br. J. Pharmacol.*) war bereits bekannt, dass die SHP-1 (SH-Domänen enthaltende Phosphatase-1) die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies reduzieren kann, ein kausaler Zusammenhang mit der NAD(P)H-Oxidase konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Stimulatoren der NAD(P)H-Oxidase Aktivität wie Angiotensin II oder Membran-Depolarisierung erhöhen die Expression von Rac1, seine GTPase Aktivität und führen zur Translokation an die Membran als wichtigem Aktivierungsschritt (Sohn *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2000; Wassmann *et al.*, 2001; Seshiah *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 1999). Wie Rac1 in Endothelzellen aktiviert wird, war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch unklar. Da es sich bei Rac 1 um eine Untereinheit der NAD(P)-Oxidase handelt (Sohn *et al.*, 2000, *J. Biol., Chem.*; Welch *et al.*, 2003; Krötz *et al.*, 2005; Krötz *et al.*, 2007), lag es für uns nahe, mögliche *Upstream*-Aktivierungswege von Rac 1 zu finden.

Aus anderen zellulären Systemen ist als *Upstream*-Aktivator von Rac beispielsweise die Phosphatidylinositol 3-Kinase bekannt (Lassegue *et al.*, 2003). Cuevas *et al.* zeigten 1999 die Dephosphorylierung der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase durch die SHP-1. Dieser Vorgang geht mit einer Reduktion der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität einher. Dies führte uns zu der Überlegung, ob die SHP-1 möglicherweise die NAD(P)H-Oxidase über Tyrosinphosphorylierungsschritte *via* Phosphatidylinositol 3-Kinase und Rac regulieren könnte.

Über eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase waren zu Beginn unserer Arbeit wenige Faktoren bekannt. Ein möglicher NAD(P)H-Oxidase hemmender Signalstoff schien das weibliche Hormon Östrogen zu sein. Takeda-Matsubara *et al.* konnten in „*vascular smooth muscle cells*“ nachweisen, dass 17 β -Estradiol die Aktivität der SHP-1 steigert

(Takeda-Matsubara *et al.*, 2002). Dies könnte einer der Wege sein, über den Östrogen seine vasoprotektiven Eigenschaften vermittelt.

Mittels Westernblot wurde in Endothelzellen (humane Umbilikalvenenendothelzellen) die SHP-1 identifiziert. Diese zeigte einerseits in O_2^- -Messungen und andererseits in direkten SHP-1-Aktivitäts-Messungen eine konstitutive Aktivität, welche die O_2^- -Produktion der NAD(P)H-Oxidase auf ein basales Maß reduzierte. Zur Hemmung der SHP-1 wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, wie die pharmakologische Inhibition mit Natrium Stibogluconat (SG) und posttranskriptionelles *Gene Silencing* mit SHP-1 Antisense Transfektion bzw. RNA-Interferenz. Zur signifikanten Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde das in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte Prinzip der Magnetofektion verwendet (Krötz *et al.*, 2003, *Mol. Ther.*; Krötz *et al.*, 2003, *J. Vasc. Res.*, Plank *et al.*, 2003, *Expert. Opin. Biol. Ther.*; Plank *et al.*, 2003, *Biol. Chem.*). Eine Ausschaltung der SHP-1 in humanen Umbilikalvenenendothelzellen resultierte in einer relevanten Zunahme der NAD(P)H-Oxidaseaktivität und damit in einer Zunahme der O_2^- -Produktion. Dadurch stellte sich die Frage, welche Interaktionspartner das Signal der SHP-1 an die NAD(P)H-Oxidase vermitteln.

In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass nach Ausschaltung der SHP-1 in Endothelzellen eine vermehrt phosphorylierte, aktive p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase vorliegt. Die pharmakologische Hemmung der Phosphatidylinositol 3-Kinase mit Wortmannin resultierte in einer Reduktion der durch Ausschaltung der SHP-1 bewirkten Zunahme der O_2^- -Produktion. Im Rac1-Pull-Down-Assay zeigte die Rac1-Aktivität eine signifikante Zunahme nach Ausschaltung der SHP-1. Dieser Effekt blieb nach Hemmung der Phosphatidylinositol 3-Kinase aus. In konfokalen Aufnahmen Immunfluoreszenz-gefärbter humaner mikrovaskulärer Endothelzellen konnte von uns eine Translokation und damit Aktivierung von Rac1 zur NAD(P)H-Oxidase nach Blockade der SHP-1 nachgewiesen werden, welche nach Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase ausblieb.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SHP-1 eine wichtige Rolle bei der Regulierung der NAD(P)H-Oxidase spielt. Das Signal der SHP-1 wird mittels Tyrosin- bzw. Phosphorylierungen über die Phosphatidylinositol 3-Kinase vermittelt, welche *via* Rac1 die NAD(P)H-Oxidase kontrolliert.

Somit könnte der SHP-1 in Endothelzellen eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung einer Endotheldysfunktion zukommen, denn ihre Aktivität ist mitverantwortlich bei der Kontrolle der O_2^- -Bildung. Daher stellt die Steuerung der SHP-1-Funktion in Endothelzellen einen interessanten Schalter dar, um oxidativem Stress entgegenzuwirken.

Als physiologischen Faktor, der diesen Signalweg beeinflusst fanden wir den bekannten Wachstumsfaktor VEGF, welcher die O_2^- -Produktion und die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in unseren Versuchen maßgeblich steigerte.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass Estradiol über eine Aktivierung der SHP-1 die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität senkt. Estradiol vermittelt seine gefäßprotektiven Wirkungen unter anderem durch Aktivierung der SHP-1, welche *via* Phosphatidylinositol 3-Kinase und Rac1 die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase reduziert.

Insgesamt stellt unsere Arbeit die SHP-1 erstmals in Zusammenhang mit der Regulierung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und klärt die zugrunde liegenden Signalmechanismen auf. Die beschriebene Funktion der SHP-1 als „molekularer Schalter“ könnte entscheidend zum medizinischen Verständnis der Feinregulation zellulärer Funktionen und der Entstehung von Krankheiten auf molekularer Ebene am Beispiel der endothelialen Superoxidradikalproduktion beitragen.

G. Abkürzungsverzeichnis

ACE	„ <i>angiotensin converting enzyme</i> “
ANOVA	„ <i>analysis of variance</i> “
AS	Antisense
ASK	Apoptose-stimulierende Kinase
AT-R	Angiotensin-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	„ <i>copy DNA</i> “
CSF-1	„ <i>colony stimulating factor-1</i> “
C-terminal	Carboxyl-terminal
DNA	„ <i>desoxyribonucleic acid</i> “
EDRF	„ <i>endothelium derived relaxing factor</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„ <i>epidermal growth factor</i> “
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Flt-1	„ <i>fms-like tyrosin kinase-1</i> “
GDI	„ <i>GDP-dissociation-inhibitor</i> “
GTPase	Guanosintriphosphatase
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Gluthation-S-Transferase
GEF	„ <i>guanin-exchange-factor</i> “
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Indo	Indometazin
ITIM	Immuno-Rezeptor, Tyrosin-basierendes, inhibitorisches Motiv
JNK	„ <i>janus-activated kinase</i> “
KDR	„ <i>kinase insert domain-containing receptor</i> “
LDL	„ <i>low density lipoprotein</i> “
L-NA	N Omega-Nitro-L-Arginin
MAP	„ <i>mitogen-activated kinase</i> “
MCP-1	„ <i>monocyte chemoattractant protein</i> “

Mg	Milligramm
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
µg	Mikrogramm
NAC	N-Acetylcystein
NAD(P)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)
NFκB	„ <i>nuclear factor κ B</i> “
Nm	Nanometer
NO	„ <i>nitric oxide</i> “
Nox	NAD(P)H-Oxidase
Nt	Nukleotide
ODN	„ <i>oligodeoxynucleotides</i> “
Ox	Oxypurinol
PAEC	„ <i>porcine aortic endothelial cell</i> “
Page	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “
PDGF	„ <i>platelet derived growth factor</i> “
PEI	Polyethylen Imin
PG	Prostaglandin
Phox	„ <i>phagocyte oxidase</i> “
PI3-K	Phosphatidylinositol-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIRB	„ <i>paired Ig- like receptor B</i> “
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	„ <i>relative light units</i> “
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	RNA-schneidendes Enzym
ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “
SDS	„ <i>sodium dodecyl sulfat</i> “

SERM	selektiver Östrogenrezeptor Modulator
SHP-1	Src Homologie-Domänen enthaltende Phosphatase
siRNA	„ <i>small interfering RNA</i> “
SOD	Superoxiddismutase
SG	„ <i>sodium stibogluconat</i> “
Sulfa	Sulfaphenazol
TNF α	Tumornekrosefaktor α
ÜNK	Übernachtkultur
VEGF	„ <i>vascular endothelial growth factor</i> “
VSMC	„ <i>vascular smooth muscle cell</i> “
WM	Wortmannin

H. Literaturverzeichnis

- Adachi, M., Fischer, E. H., Ihle, J., Imai, K., Jirik, F., Neel, B., Pawson, T., Shen, S., Thomas, M., Ullrich, A., and Zhao, Z.** (1996). Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. *Cell*. **85**, 15.
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers S., Bosse, D. C., Lawley, T. J.** (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. **99**(6), 683-90.
- Albrecht, E. W., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H., and van Goor, H.** (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J.Pathol*. **199**, 8-17.
- Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R.** (1999). Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J.Biol.Chem*. **274**, 842-848.
- Babior, B. M.** (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*. **93**, 1464-1476.
- Babior, B. M.** (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB.Life*. **50**, 267-269.
- Ballinger, S. W., Patterson, C., Yan, C. N., Doan, R., Burow, D. L., Young, C. G., Yakes, F. M., Van Houten, B., Ballinger, C. A., Freeman, B. A., and Runge, M. S.** (2000). Hydrogen pero. *Circ.Res*. **86**, 960-966.
- Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E.** (1994). Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. **28**(8), 1176-9.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K. H.** (2000). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*. **287**, 138-142.
- Barber, M. N., Sampey, D. B., and Widdop, R. E.** (1999). AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*. **34**, 1112-1116.
- Bassermann F, Jahn T, Miething C, Seipel P, Bai RY, Coutinho S, Tybulewicz VL, Peschel C, Duyster J.** (2002). Association of Bcr-Abl with the proto-oncogene Vav is implicated in activation of the Rac-1 pathway. *J Biol Chem*. **277**(14):12437-45.
- Bayraktutan, U., Draper, N., Lang, D., and Shah, A. M.** (1998). Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc.Res*. **38**, 256-262.

- Beckman, K. B. and Ames, B. N.** (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* **78**, 547-581.
- Berg, K. L., Carlberg, K., Rohrschneider, L. R., Siminovitch, K. A., and Stanley, E. R.** (1998). The major SHP-1-binding, tyrosine-phosphorylated protein in macrophages is a member of the KIR/LIR family and an SHP-1 substrate. *Oncogene.* **17**, 2535-2541.
- Binstadt, B. A., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Scharenberg, A. M., Williams, B. L., Colonna, M., Lanier, L. L., Kinet, J. P., Abraham, R. T., and Leibson, P. J.** (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity.* **5**, 629-638.
- Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348 Pt 2**, 241-255.
- Blalock, W. L., Weinstein-Opppenheimer, C., Chang, F., Hoyle, P. E., Wang, X. Y., Algate, P. A., Franklin, R. A., Oberhaus, S. M., Steelman, L. S., and McCubrey, J. A.** (1999). Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia.* **13**, 1109-1166.
- Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, Pohl U.** (2000). Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* **14(2)**:255-60.
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., and Lerman, A.** (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**, 168-175.
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J. L., Therond, P., Peynet, J., Legrand, A., and Delattre, J.** (2004). [Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts]. *Ann.Pharm.Fr.* **62**, 147-157.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
- Cadenas, E. and Davies, K. J.** (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic.Biol.Med.* **29**, 222-230.
- Cai, H. and Harrison, D. G.** (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* **87**, 840-844.
- Carpenter, C. L. and Cantley, L. C.** (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**, 153-158.
- Caulin-Glaser, T., Garcia-Cardena, G., Sarrel, P., Sessa, W. C., and Bender, J. R.** (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca2+ mobilization. *Circ.Res.* **81**, 885-892.

- Chen, H. E., Chang, S., Trub, T., and Neel, B. G.** (1996). Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol.Cell Biol.* **16**, 3685-3697.
- Chen, X. L., Tummala, P. E., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., and Medford, R. M.** (1998). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* **83**, 952-959.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D.** (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* **269**, 131-140.
- Chisolm, G. M. and Steinberg, D.** (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic.Biol.Med.* **28**, 1815-1826.
- Cho, A., Courtman, D. W., Langille, B. L.** (1995). Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res.* **76**(2),168-75.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y. C., Olander, J. V., Connolly, D. T., and Stern, D.** (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J.Exp.Med.* **172**, 1535-1545.
- Clement, M. V. and Pervaiz, S.** (1999). Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis. *Free Radic.Res.* **30**, 247-252.
- Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppeley, B. L., Delfino, J. J., Siegel, N. R., Leimgruber, R. M., and Feder, J.** (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J.Clin.Invest.* **84**, 1470-1478.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R.** (2002). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* **16**;39(2), 257-65.
- Cosentino, F., Patton, S., d'Uscio, L. V., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Moreau, P., Malinski, T., and Luscher, T. F.** (1998). Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J.Clin.Invest* **101**, 1530-1537.
- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Mills, G. B.** (1999). SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J.Biol.Chem.* **274**, 27583-27589.
- Cuevas, B. D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., and Mills, G. B.** (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.* **276**, 27455-27461.

- Cui, T., Nakagami, H., Iwai, M., Takeda, Y., Shiuchi, T., Daviet, L., Nahmias, C., and Horiuchi, M.** (2001). Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT2 receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc.Res.* **49**, 863-871.
- David, M., Chen, H. E., Goelz, S., Larner, A. C., and Neel, B. G.** (1995). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol.Cell Biol.* **15**, 7050-7058.
- Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J., and Zeiher, A. M.** (1997). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ.Res.* **81**, 970-976.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature.* **420**, 629-635.
- Feng, G. S.** (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp.Cell Res.* **253**, 47-54.
- Ferdinandy, P. and Schulz, R.** (2003). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br.J.Pharmacol.* **138**, 532-543.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**, 806-811.
- Fleming, I., Michaelis, U. R., Bredenkotter, D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R. P., and Busse, R.** (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ.Res.* **88**, 44-51.
- Frey, R. S., Rahman, A., Kefer, J. C., Minshall, R. D., and Malik, A. B.** (2002). PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ.Res.* **90**, 1012-1019.
- Fridovich, I.** (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **23**, 239-257.
- Fridovich, I.** (1985). Cytochrom c, Handbook of Methods for oxygen radical Research 1985.
- Fridovich, I.** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* **64**, 97-112.
- Fridovich, I.** (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J.Biol.Chem.* **272**, 18515-18517.
- Galley, H. F., Howdle, P. D., Walker, B. E., and Webster, N. R.** (1997). The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic.Biol.Med.* **23**, 768-774.

- Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA.** (2002). Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. **105**(13), 1567-72.
- Gragasin, F. S., Xu, Y., Arenas, I. A., Kainth, N., and Davidge, S. T.** (2003). Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. **23**, 38-44.
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., and Alexander, R. W.** (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res*. **74**, 1141-1148.
- Griendling, K. K. and Ushio-Fukai, M.** (1998). Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J.Lab Clin.Med*. **132**, 9-15.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M.** (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res*. **86**, 494-501.
- Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, Arstall MA, Smith TW, Balligand JL, Kelly RA.** (1996). Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **28;93**(11), 5604-9.
- Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Wacławski M, Cannon RO 3rd.** (1997). The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. **96**(9), 2795-801.
- Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., and Channon, K. M.** (2000). Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ.Res*. **86**, E85-E90.
- Haklar, G., Ulukaya-Durakbasa, C., Yuksel, M., Dagli, T., and Yalcin, A. S.** (1998). Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **25**, 908-912.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Wacławski MA, Nour KR, Quyyumi AA.** (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. **106**(6), 653-8.
- Harrison, D. G.** (1997). Endothelial function and oxidant stress. *Clin.Cardiol*. **20**, II-7.
- Heitzer, T., Brockhoff, C., Mayer, B., Warnholtz, A., Mollnau, H., Henne, S., Meinertz, T., and Munzel, T.** (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ.Res*. **86**, E36-E41.

- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T.**(2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. **104**(22), 2673-8.
- Hishikawa, K. and Luscher, T. F.** (1997). Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* **96**, 3610-3616.
- Huie, R. E. and Padmaja, S.** (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radic.Res.Commun.* **18**, 195-199.
- Hunter, T.** (1996). Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Biochem.Soc.Trans.* **24**, 307-327.
- Ichiki, T., Labosky, P. A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B. L., and Inagami, T.** (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* **377**, 748-750.
- Inoue, N., Kawashima, S., Hirata, K. I., Rikitake, Y., Takeshita, S., Yamochi, W., Akita, H., and Yokoyama, M.** (1998). Stretch force on vascular smooth muscle cells enhances oxidation of LDL via superoxide production. *Am.J.Physiol* **274**, H1928-H1932.
- Kamata H, Hirata H.** (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* **11**(1), 1-14. Review.
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T.** (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.
- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., and Lodish, H. F.** (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-738.
- Klotz, L. O., Schroeder, P., and Sies, H.** (2002). Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic.Biol.Med.* **33**, 737-743.
- Knepler, J. L., Jr., Taher, L. N., Gupta, M. P., Patterson, C., Pavalko, F., Ober, M. D., and Hart, C. M.** (2001). Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **281**, C1064-C1075.
- Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T., and Siminovitch, K. A.** (1996). The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 3856-3862.
- Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S.** (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.* **5**, 834-842.

- Kroll, J. and Waltenberger, J.** (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 32521-32527.
- Krotz, F., de Wit, C., Sohn, H. Y., Zahler, S., Gloe, T., Pohl, U., and Plank, C.** (2003). Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol.Ther.* **7**, 700-710.
- Krotz F, Engelbrecht B, Buerkle MA, Bassermann F, Bridell H, Gloe T, Duyster J, Pohl U, Sohn HY.** (2005). The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J Am Coll Cardiol.* **45**(10):1700-6.
- Krotz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, Duyster J, Cohen CD, Schuhmann C, Klauss V, Pohl U, Stempfle HU, Sohn HY.** (2007). Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension.* **49**(1):201-8.
- Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, Pohl U.** (2004). Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**(3):595-600.
- Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U.** (2003). Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res.* **40**(5):425-34.
- Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U.** (2002). NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* **100**(3):917-24.
- Krotz F, Sohn HY, Keller M, Gloe T, Bolz SS, Becker BF, Pohl U.** (2002). Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**(12), 2003-9.
- Krotz F, Sohn HY, Pohl U.** (2004). Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**(11), 1988-96.
- Kruger, J., Butler, J. R., Cherapanov, V., Dong, Q., Ginzberg, H., Govindarajan, A., Grinstein, S., Siminovitch, K. A., and Downey, G. P.** (2000). Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in moth-eaten mice. *J.Immunol.* **165**, 5847-5859.
- Kunsch, C. and Medford, R. M.** (1999). Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ.Res.* **85**, 753-766.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **15**;227(5259), 680-5.
- Lambeth, J. D., Cheng, G., Arnold, R. S., and Edens, W. A.** (2000). Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 459-461.

- Lambeth, J. D.** (2002). Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr.Opin.Hematol.* **9**, 11-17.
- Lassegue, B. and Clempus, R. E.** (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **285**, R277-R297.
- Law, C. L., Sidorenko, S. P., Chandran, K. A., Zhao, Z., Shen, S. H., Fischer, E. H., and Clark, E. A.** (1996). CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. *J.Exp.Med.* **183**, 547-560.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N.** (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
- Li, C. and Jackson, R. M.** (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **282**, C227-C241.
- Li, J. M. and Shah, A. M.** (2002). Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 19952-19960.
- Li, P. F., Dietz, R., and von Harsdorf, R.** (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **96**, 3602-3609.
- Lopez, F., Esteve, J. P., Buscail, L., Delesque, N., Saint-Laurent, N., Theveniau, M., Nahmias, C., Vaysse, N., and Susini, C.** (1997). The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. *J.Biol.Chem.* **272**, 24448-24454.
- Lu, G., Greene, E. L., Nagai, T., and Egan, B. M.** (1998). Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **32**, 1003-1010.
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P.** (1986). Paradoxical Engl vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N J Med.* **315**(17), 1046-51.
- Maeda, A., Scharenberg, A. M., Tsukada, S., Bolen, J. B., Kinet, J. P., and Kurosaki, T.** (1999). Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* **18**, 2291-2297.
- Mahmoud, A. A. and Warren, K. S.** (1977). Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases. XXIV. Leishmaniasis. *J.Infect.Dis.* **136**, 160-163.
- Marumo, T., Schini-Kerth, V. B., Fisslthaler, B., and Busse, R.** (1997). Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* **96**, 2361-2367.

- Massey, V.** (1959). The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim.Biophys.Acta* **34**, 255-256.
- Mayer, B. J. and Gupta, R.** (1998). Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **228**, 1-22.
- McCord, J. M. and Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.* **244**, 6049-6055.
- Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H.** (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N.Engl.J.Med.* **340**, 1801-1811.
- Meyer, J. W. and Schmitt, M. E.** (2000). A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* **472**, 1-4.
- Michiels, C.** (2003). Endothelial cell functions. *J.Cell Physiol* **196**, 430-443.
- Minetti, M., Mallozzi, C., and Di Stasi, A. M.** (2002). Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling. *Free Radic.Biol.Med.* **33**, 744-754.
- Missy, K., Van, P., V, Raynal, P., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., Chap, H., and Payrastre, B.** (1998). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase interact with Rac1 GTPase and stimulate GDP dissociation. *J.Biol.Chem.* **273**, 30279-30286.
- Mizuno, K., Katagiri, T., Hasegawa, K., Ogimoto, M., and Yakura, H.** (1996). Hematopoietic cell phosphatase, SHP-1, is constitutively associated with the SH2 domain-containing leukocyte protein, SLP-76, in B cells. *J.Exp.Med.* **184**, 457-463.
- Mohazzab, K. M., Kaminski, P. M., and Wolin, M. S.** (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am.J.Physiol.* **266**, H2568-H2572.
- Moss, E. G.** (2001). RNA interference: it's a small RNA world. *Curr.Biol.* **11**, R772-R775.
- Mugge, A., Elwell, J. H., Peterson, T. E., Hofmeyer, T. G., Heistad, D. D., and Harrison, D. G.** (1991). Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ.Res.* **69**, 1293-1300.
- Mugge, A., Elwell, J. H., Peterson, T. E., and Harrison, D. G.** (1991). Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am.J.Physiol.* **260**, C219-C225.
- Munzenmaier, D. H. and Greene, A. S.** (1996). Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* **27**, 760-765.
- Neel, B. G., Gu, H., and Pao, L.** (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem.Sci.* **28**, 284-293.

- Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Söregi G, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K.** (2000). Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* **35**(2):277-83.
- Nielsen, L. B.** (1999). Atherogenicity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. *Atherosclerosis.* **143**, 229-243.
- Ohara, Y., Peterson, T. E., and Harrison, D. G.** (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J.Clin.Invest* **91**, 2546-2551.
- Pagano, P. J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P. M., Tauber, A. I., and Cohen, R. A.** (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am.J.Physiol.* **268**, H2274-H2280.
- Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B., and Siminovitch, K. A.** (1995). Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J.Exp.Med.* **181**, 2077-2084.
- Pathak, M. K. and Yi, T.** (2001). Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J.Immunol.* **167**, 3391-3397.
- Patterson, C., Ruef, J., Madamanchi, N. R., Barry-Lane, P., Hu, Z., Horaist, C., Ballinger, C. A., Brasier, A. R., Bode, C., and Runge, M. S.** (1999). Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* **274**, 19814-19822.
- Paulson, R. F., Vesely, S., Siminovitch, K. A., and Bernstein, A.** (1996). Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat.Genet.* **13**, 309-315.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G.** (2001). Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* **104**(2), 191-6.
- Plank, C., Anton, M., Rudolph, C., Rosenecker, J., and Krotz, F.** (2003). Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **3**, 745-758.
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Remy, J. S., Krotz, F., Anton, M., Lausier, J., and Rosenecker, J.** (2003). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol.Chem.* **384**, 737-747.
- Plas, D. R., Johnson, R., Pingel, J. T., Matthews, R. J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A. C., and Thomas, M. L.** (1996). Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science.* **272**, 1173-1176.

- Plouet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D.** (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* **8**, 3801-3806.
- Pritsos, C. A.** (2000). Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chem.Biol.Interact.* **129**, 195-208.
- Pueyo, M. E. and Michel, J. B.** (1997). Angiotensin II receptors in endothelial cells. *Gen.Pharmacol.* **29**, 691-696.
- Puntarulo, S. and Cederbaum, A. I.** (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic.Biol.Med.* **24**, 1324-1330.
- Rameh, L. E. and Cantley, L. C.** (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J.Biol.Chem.* **274**, 8347-8350.
- Riedel M, Rafflenbeul W, Lichtlen P.** (1993). Ovarian sex steroids and atherosclerosis. *Clin Investig.* **71**(5), 406-12. Review.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, Couse JF, Curtis SW, Korach KS.** (1997). Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest.* **15**;99(10), 2429-37.
- Rueckschloss, U., Quinn, M. T., Holtz, J., and Morawietz, H.** (2002). Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1845-1851.
- Ruef, J., Hu, Z. Y., Yin, L. Y., Wu, Y., Hanson, S. R., Kelly, A. B., Harker, L. A., Rao, G. N., Runge, M. S., and Patterson, C.** (1997). Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ.Res.* **81**, 24-33.
- Sambrook J, Gething MJ.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* **16**;342(6247), 224-5.
- Satriano, J. A., Shuldiner, M., Hora, K., Xing, Y., Shan, Z., and Schlondorff, D.** (1993). Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J.Clin.Invest* **92**, 1564-1571.
- Schachinger, V., Britten, M. B., and Zeiher, A. M.** (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* **101**, 1899-1906.
- Schlessinger, J. and Ullrich, A.** (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron.* **9**, 383-391.

- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **103**, 211-225.
- Schmidt, A. and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587-1609.
- Schoenberg, M. H. and Beger, H. G.** (1993). Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* **21**, 1376-1386.
- Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., and Griendling, K. K.** (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ.Res.* **91**, 406-413.
- Shibasaki, Y., Matsubara, H., Nozawa, Y., Mori, Y., Masaki, H., Kosaki, A., Tsutsumi, Y., Uchiyama, Y., Fujiyama, S., Nose, A., Iba, O., Tateishi, E., Hasegawa, T., Horiuchi, M., Nahmias, C., and Iwasaka, T.** (2001). Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension*. **38**, 367-372.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H.** (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J.Biol.Chem.* **276**, 1417-1423.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. **29;359**(6398), 843-5.
- Sohn, H. Y., Raff, U., Hoffmann, A., Gloe, T., Heermeier, K., Galle, J., and Pohl, U.** (2000). Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br.J.Pharmacol.* **131**, 667-672.
- Sohn, H. Y., Keller, M., Gloe, T., Morawietz, H., Rueckschloss, U., and Pohl, U.** (2000). The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 18745-18750.
- Sohn, H. Y., Krotz, F., Gloe, T., Keller, M., Theisen, K., Klauss, V., and Pohl, U.** (2003). Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovasc.Res.* **58**, 638-646.
- Somers, M. J., Burchfield, J. S., and Harrison, D. G.** (2000). Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid.Redox.Signal.* **2**, 779-787.
- Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K., Sorescu, G. P., Valppu, L., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., Vega, J. D., Taylor, W. R., and Griendling, K. K.** (2002). Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. **105**, 1429-1435.
- St Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., and Brand, M. D.** (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J.Biol.Chem.* **277**, 44784-44790.

- Steinbrecher, U. P.** (1988). Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta.* **959**, 20-30.
- Stoll, M., Steckelings, U. M., Paul, M., Bottari, S. P., Metzger, R., and Unger, T.** (1995). The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J.Clin.Invest.* **95**, 651-657.
- Suwaidi, J. A., Hamasaki, S., Higano, S. T., Nishimura, R. A., Holmes, D. R., Jr., and Lerman, A.** (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* **101**, 948-954.
- Takeda-Matsubara, Y., Nakagami, H., Iwai, M., Cui, T. X., Shiuchi, T., Akishita, M., Nahmias, C., Ito, M., and Horiuchi, M.** (2002). Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension.* **39**, 41-45.
- Takeya, M., Yoshimura, T., Leonard, E. J., and Takahashi, K.** (1993). Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum.Pathol.* **24**, 534-539.
- Tarpey, M. M. and Fridovich, I.** (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ.Res.* **89**, 224-236.
- Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A., and Bohmer, F. D.** (1995). Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J.Biol.Chem.* **270**, 21277-21284.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L.** (1999). Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* **34**, 976-982.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L.** (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J.Hypertens.* **19**, 1245-1254.
- Touyz, R. M.** (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **37**, 1263-1273.
- Tsuzuki, S., Matoba, T., Eguchi, S., and Inagami, T.** (1996). Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension.* **28**, 916-918.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., Pagano, P. J., Johnson, C., and Alexander, R. W.** (2002). Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ.Res.* **91**, 1160-1167.

- Ushio-Fukai M.** (2006). Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* **71**(2):226-35. Review.
- Van Vactor, D., O'Reilly, A. M., and Neel, B. G.** (1998). Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8**, 112-126.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G., and Waterfield, M. D.** (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 267-272.
- Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C.** (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol.Lett.* **140-141**, 113-124.
- Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A., and Topol, E. J.** (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* **361**, 2017-2023.
- Wagner, A. H., Schroeter, M. R., and Hecker, M.** (2001). 17 β -estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J.* **15**, 2121-2130.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C. H.** (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* **269**, 26988-26995.
- Wang, H. D., Xu, S., Johns, D. G., Du, Y., Quinn, M. T., Cayatte, A. J., and Cohen, R. A.** (2001). Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ.Res.* **88**, 947-953.
- Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Brasen, J. H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J. P., Griendling, K. K., Harrison, D. G., Bohm, M., Meinertz, T., and Munzel, T.** (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* **99**, 2027-2033.
- Warnholtz, A., Wendt, M., and Munzel, T.** (2002). When sleeping beauty turns ugly: mitochondria in hypoxia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 525-527.
- Wassmann, S., Laufs, U., Baumer, A. T., Muller, K., Konkol, C., Sauer, H., Bohm, M., and Nickenig, G.** (2001). Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol.Pharmacol.* **59**, 646-654.
- Wassmann, S., Laufs, U., Stamenkovic, D., Linz, W., Stasch, J. P., Ahlbory, K., Rosen, R., Bohm, M., and Nickenig, G.** (2002). Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation.* **105**, 2083-2091.
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T.** (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* **546**, 93-97.

- Werner, E.** (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J.Cell Sci.* **117**, 143-153.
- Wolin, M. S.** (2000). Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**, 1430-1442.
- Wolin, M. S., Gupte, S. A., and Oeckler, R. A.** (2002). Superoxide in the vascular system. *J.Vasc.Res.* **39**, 191-207.
- Xu, Y., Swerlick, R. A., Sepp, N., Bosse, D., Ades, E. W., Lawley, T. J.** (1994). Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol.* **102**(6), 833-7.
- Yasunari, K., Maeda, K., Nakamura, M., and Yoshikawa, J.** (2002). Pressure promotes angiotensin II-mediated migration of human coronary smooth muscle cells through increase in oxidative stress. *Hypertension.* **39**, 433-437.
- Yi, T. and Ihle, J. N.** (1993). Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol.Cell Biol.* **13**, 3350-3358.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., and Backer, J. M.** (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol.Cell Biol.* **18**, 1379-1387.
- Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Minieri, C. A., Akers, M., Lassegue, B., and Griendling, K. K.** (1999). Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid.Redox.Signal.* **1**, 167-179.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* **101**, 25-33.
- Zhan, Y., Virbasius, J. V., Song, X., Pomerleau, D. P., and Zhou, G. W.** (2002). The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides. *J.Biol.Chem.* **277**, 4512-4518.
- Zhang, J., Somani, A. K., and Siminovitch, K. A.** (2000). Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin.Immunol.* **12**, 361-378.
- Zhang, Z., Blake, D. R., Stevens, C. R., Kanczler, J. M., Winyard, P. G., Symons, M. C., Benboubetra, M., and Harrison, R.** (1998). A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Radic.Res.* **28**, 151-164.
- Zouki, C., Zhang, S. L., Chan, J. S., and Filep, J. G.** (2001). Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* **15**, 25-27.

Zulueta, J. J., Sawhney, R., Yu, F. S., Cote, C. C., and Hassoun, P. M. (1997). Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am.J.Physiol.* **272**, L897-L902.

I. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch
Geburtsdatum	21. Januar 1979
Geburtsort	Nürnberg

AUSBILDUNGSDATEN

1985-1989	Grundschule Hersbruck an der Pegnitz
1989-1998	Gymnasium Hersbruck an der Pegnitz
1998-1999	Chemiestudium an der LMU München
1999-2006	Medizinstudium an der LMU München
2002-2004	Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München
Ab Juli 2006	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der LMU München

VERÖFFENTLICHUNG

Krotz F, Engelbrecht B, Buerkle MA, Bassermann F, Bridell H, Gloe T, Duyster J, Pohl U, Sohn HY. (2005). The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J Am Coll Cardiol.* **45**(10):1700-6.

K. Danksagung

Ich danke ganz besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. U. Pohl für die hervorragende fachliche Anleitung und überaus wertvollen Diskussionen. So wurde meine Ausbildung sowohl durch seine fachliche Beratung, als auch persönliche Betreuung in entscheidender Weise geprägt.

Ein besonderer Dank gilt ebenso PD Dr. med. F. Krötz, der durch sein außerordentliches Engagement, seine Geduld und ausgezeichnete persönliche und fachliche Betreuung maßgeblich an dem Entstehen dieser Arbeit beteiligt ist.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich auch bei den anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für kardiovaskuläre Physiologie der LMU München, die ich im Laufe der Zeit sowohl fachlich als auch menschlich zu schätzen gelernt habe, für ihre stete Hilfsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben und mich darüber hinaus auch in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Meinem Mann, der während der gesamten Arbeit mit viel Verständnis eine unendlich große Stütze und Rückhalt für mich war und somit auch einen wesentlichen Anteil an dem Entstehen dieser Arbeit hat, möchte ich herzlich danken.